



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/12, 15/86, 15/87, 5/10, C07K 14/775, A61K 48/00, 9/00, 38/17		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 96/37608 (43) Date de publication internationale: 28 novembre 1996 (28.11.96)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR96/00747 (22) Date de dépôt international: 20 mai 1996 (20.05.96) (30) Données relatives à la priorité: 95/06061 22 mai 1995 (22.05.95) FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). INSTITUT PASTEUR DE LILLE [FR/FR]; 1, rue du Professeur-Calmette, F-59000 Lille (FR). UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE [DE/DE]; 4, place Jussieu, F-75005 Paris (DE). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): ASSMANN, Gerd [DE/DE]; Nünningweg 49, D-48161 Münster (DE). BENOIT, Patrick [FR/FR]; 24, rue Jonquay, F-75014 Paris (FR). BRUCKERT, Eric [FR/FR]; 6, rue du Professeur-Calmette, F-92190 Meudon (FR). DENEFLÉ, Patrice [FR/FR]; 45, avenue des Fusillés-de-Châteaubriand, F-94100 Saint-Maur (FR). DUVERGER, Nicolas [FR/FR]; 1, rue Martel, F-75010 Paris (FR). FRUCHART, Jean-Charles [FR/FR]; Domaine du Ginkgo, 50, rue de la Camoy, F-59130 Lambersart (FR). LUC, Géraud [FR/FR]; 5, rue du Hainaut, F-59700 Marq-en-Baroeuil (FR). TURPIN, Gérard		[FR/FR]; 99, rue de Sèvres, F-75006 Paris (FR). FUNKE, Harald [DE/DE]; Gerhardstrasse 13, D-48145 Münster (DE). (74) Mandataire: LOBJOIS, Françoise; Rhône-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92165 Antony Cédex (FR). (81) Etats désignés: AU, BR, CA, CN, CZ, HU, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RU, SI, SK, UA, US, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée Avec rapport de recherche internationale.	
(54) Title: NOVEL VARIANTS OF APOLIPOPROTEIN A-I (54) Titre: NOUVEAUX VARIANTS DE L'APOLIPOPROTEINE A-I (57) Abstract <p>The present invention relates to variants of the human apolipoprotein A-I comprising a cysteine in position 151, the corresponding nucleic acids and the vectors containing them. It also relates to pharmaceutical compositions comprising said elements and their utilization, particularly in genic therapy.</p> (57) Abrégé <p>La présente invention concerne des variants de l'apolipoprotéine A-I humaine comprenant une cystéine en position 151, les acides nucléiques correspondants et les vecteurs les contenant. Elle concerne également des compositions pharmaceutiques comprenant ces éléments et leur utilisation, notamment en thérapie génique.</p>			

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

NOUVEAUX VARIANTS DE L'APOLIPOPROTEINE A-I

La présente invention concerne un nouveau variant de l'apolipoprotéine A-I. Elle concerne aussi tout acide nucléique codant pour ce nouveau variant. Elle concerne également l'utilisation de ces protéine ou
5 acides nucléiques dans un but thérapeutique. Plus particulièrement, l'invention concerne un nouveau variant de l'apolipoprotéine A-I comportant notamment une mutation en position 151.

L'apolipoprotéine A-I (apoA-I) est le constituant majeur des lipoprotéines de haute densité (HDL), qui sont des complexes
10 macromoléculaires composés de cholestérol, phospholipides et de triglycérides. L'apoA-I est une protéine constituée de 243 acides aminés, synthétisée sous la forme d'une préproprotéine de 267 résidus, ayant une masse moléculaire de 28.000 daltons. La forme prépro de l'apoA-I est synthétisée chez l'homme à la fois par le foie et l'intestin. Cette forme de
15 protéine est ensuite clivée en proprotéine qui est sécrétée dans le plasma. Dans le compartiment vasculaire, la proapoA-I est alors transformée en protéine mature (243 acides aminés) par action d'une protéase calcium dépendante. L'apoA-I a un rôle de structure et un rôle actif dans le métabolisme des lipoprotéines: l'apoA-I est notamment un cofacteur de la
20 lécithine cholestérol acyltransférase (LCAT), responsable de l'estérification du cholestérol plasmatique.

Le niveau de cholestérol contenu dans la fraction HDL et la concentration plasmatique de l'apoA-I sont des facteurs de risque négatifs pour le développement de l'athérosclérose chez l'homme. Les études
25 épidémiologiques ont en effet démontré une corrélation inverse entre les concentrations de cholestérol HDL et d'apoA-I et l'incidence des maladies cardio-vasculaires (E. G. Miller et al. Lancet, 1977:965-968). En revanche, une longévité serait associée avec un taux de cholestérol HDL élevé. Récemment, le rôle protecteur de l'apoA-I a été démontré dans un modèle de

souris transgéniques exprimant l'apolipoprotéine A-I humaine (Rubin et al. Nature). De même, l'infusion des HDL chez le lapin induit une régression des lésions (Badimon et al. J. Clin. Invest. 85, 1234-41, 1990). Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer l'effet protecteur des HDL, et notamment un rôle des HDL dans le transport inverse du cholestérol (Fruchart et al. Circulation, 87: 22-27, 1993) et une action antioxydant des HDL (Forte T., Current Opinion in Lipidology, 5: 354-364, 1994)).

Le gène codant pour l'apoA-I a été cloné et séquencé (Sharpe et al., Nucleic Acids Res. 12(9) (1984) 3917). Ce gène, d'une longueur de 1863 pb, comprend 4 exons et 3 introns. L'ADNc codant pour l'apoA-I a également été décrit (Law et al., PNAS 81 (1984) 66). Cet ADNc comprend 840 pb (Cf SEQ ID n° 1). Outre la forme sauvage de l'apoA-I, différents variants naturels ont été décrits dans l'art antérieur, dont les différences par rapport à la protéine sauvage sont données dans le tableau ci-après.

Variant:	Mutation	Variant	Mutation
Milano	Arg173Cys	Norway	Glu136Lys
Marburg	Lys107Ø		Pro165Arg
Munster2B	Ala158Glu		Pro3His
Giessen	Pro143Arg		Arg10Leu
Munster3A	Asp103Asn		Gly26Arg
Munster3B	Pro4Arg		Asp89Glu
Munster3C	Pro3Arg		Lys107Met
Munster3D	Asp213Gly		Glu139Gly
Munster4	Glu198Lys		Glu147Val
Yame	Asp13Tyr		Ala158Glu
	Asp213Gly		Glu169Gln
			Arg177His

La présente invention découle de la mise en évidence d'une nouvelle série de variants de l'apolipoprotéine A-I. Cette série de variant présente en particulier une substitution du résidu arginine en position 151 par un résidu cystéine. Le variant d'apoA-I selon l'invention présente des propriétés thérapeutiques remarquables. En particulier, il possède des propriétés de protection anti-athérogène particulièrement importantes. Ainsi, dans une situation de niveaux extrêmement bas de cholestérol dans la fraction HDL, associée à une hypertriglycémie, la présence de ce variant prévient le développement de toute athérosclérose, témoignant d'un rôle protecteur très puissant, spécifique à cette apoA-I mutée. En outre, la présence d'une cystéine sur l'apoA-I selon l'invention entraîne la formation de dimères et d'autres complexes reliés par un pont disulfure. Cette apoA-I se retrouve sous forme libre dans le plasma, liée en dimère à elle-même ou associée avec l'apolipoprotéine A-II qui est une autre protéine importante associée au HDL et qui possède aussi une cystéine dans sa séquence. Par ailleurs, la perte de la charge liée à l'arginine en position 151 entraîne la visualisation de ce mutant par électroisofocalisation des protéines plasmatiques suivi d'une révélation immunologique de l'apoA-I.

Compte tenu de ses propriétés anti-athérogènes particulièrement remarquables, cette nouvelle protéine selon l'invention offre un avantage thérapeutique important dans le traitement et la prévention des pathologies cardiovasculaires.

Un premier objet de l'invention concerne donc une série de variants de l'apolipoprotéine A-I humaine comprenant une cystéine en position 151. La séquence d'acides aminés de l'apoA-I de référence est décrite dans la littérature (Cf Law précitée). Cette séquence, incluant la région prepro (résidus 1 à 24), est présentée sur la séquence SEQ ID n° 1. Une caractéristique des variants selon l'invention réside donc dans la présence d'une cystéine en position 151 de l'apoA-I mature (correspondant à la position 175 sur la séquence SEQ ID n° 1), en substitution de l'arginine

présente dans la séquence de référence. Un variant préféré selon l'invention comprend la séquence peptidique SEQ ID n° 2, et, encore plus préférentiellement, la séquence peptidique comprise entre les résidus 68 à 267 de la séquence SEQ ID n° 1, le résidu 175 étant substitué par une
5 cystéine.

Les variants selon l'invention sont représentés notamment par l'apoA-I Paris, c'est-à-dire une apoA-I présentant une cystéine en position 151 par rapport à l'apoA-I native. Les variants selon l'invention peuvent également porter d'autres modifications structurales par rapport à l'apolipoprotéine A-I
10 de référence, et notamment d'autres mutations, délétions et/ou additions. Selon un mode particulier, les variants de l'invention comprennent également d'autres mutations conduisant au remplacement de résidus par des cystéines. Ainsi, un autre variant particulier combine les mutation présentes dans le variant apoA-I Paris et apoA-I milano. D'autres mutations peuvent
15 également être présentes affectant des résidus ne modifiant pas de manière significative les propriétés de l'apoA-I. L'activité de ces variants peut être vérifiée notamment par un test d'efflux du cholestérol.

Les variants selon l'invention peuvent être obtenus de différentes façons. Ils peuvent tout d'abord être synthétisés chimiquement, grace aux
20 techniques de l'homme du métier utilisant des synthétiseurs de peptides. Ils peuvent également être obtenus à partir de l'apoA-I de référence, par mutation(s). Avantageusement, il s'agit de protéines recombinantes, c'est-à-dire obtenues par expression dans un hôte cellulaire d'un acide nucléique correspondant comme décrit plus loin.

25 Comme indiqué plus haut, les variants selon l'invention peuvent se trouver sous forme monomérique ou sous forme de dimère. La présence d'une cystéine au moins dans la séquence des variants de l'invention permet en effet la réalisation de dimères par liaison disulfure. Il peut s'agir d'homodimères, c'est à dire de dimères comprenant deux variants selon

l'invention (exemple : diApoA-I Paris); ou d'hétérodimères, c'est à dire de dimères comprenant un variant selon l'invention et une autre molécule possédant une cystéine libre (exemple :ApoA-I Paris:ApoAII).

Un autre objet de l'invention réside dans un acide nucléique codant
5 pour un variant d'apolipoprotéine A-I tel que défini ci-avant. L'acide nucléique de la présente invention peut être un acide désoxyribonucléique (ADN) ou un acide ribonucléique (ARN). Parmi les ADN, il peut s'agir d'un ADN complémentaire (ADNc), d'un ADN génomique (ADNg), d'une séquence hybride ou d'une séquence synthétique ou semi-synthétique. Il peut en outre
10 s'agir d'un acide nucléique modifié chimiquement, par exemple en vue d'augmenter sa résistance aux nucléases, sa pénétration ou son ciblage cellulaires, son efficacité thérapeutique, etc. Ces acides nucléiques peuvent être d'origine humaine, animale, végétale, bactérienne, virale, synthétique, etc. Ils peuvent être obtenus par toute technique connue de l'homme du
15 métier, et notamment par criblage de banques, par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage de banques.

Avantageusement, l'acide nucléique est un ADNc ou un ADNg.

Préférentiellement, l'acide nucléique selon l'invention comprend la
20 séquence SEQ ID n° 2. Encore plus préférentiellement, il comprend la séquence SEQ ID n° 10.

L'acide nucléique selon l'invention comprend avantageusement une région promotrice de la transcription fonctionnelle dans la cellule ou l'organisme cible, ainsi qu'une région située en 3', et qui spécifie un signal de
25 fin transcriptionnelle et un site de polyadénylation. L'ensemble de ces éléments constitue la cassette d'expression. Concernant la région promotrice, il peut s'agir de la région promotrice naturellement responsable de l'expression du gène de l'apoA-I ou d'un variant de l'ApoA-I lorsque celle-ci

est susceptible de fonctionner dans la cellule ou l'organisme concernés. Il peut également s'agir de régions d'origine différente (responsables de l'expression d'autres protéines, ou même synthétiques). Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome de la cellule cible. Parmi les promoteurs eucaryotes, on peut utiliser tout promoteur ou séquence dérivée stimulant ou réprimant la transcription d'un gène de façon spécifique ou non, inductible ou non, forte ou faible. Il peut s'agir en particulier de promoteurs ubiquitaires (promoteur des gènes HPRT, PGK, vimentine, α -actine, tubuline, etc), de promoteurs de gènes thérapeutiques (par exemple le promoteur des gènes MDR, CFTR, Facteur VIII, etc) de promoteurs spécifiques de tissus (promoteur du gène pyruvate kinase, villine, protéine intestinale de liaison des acides gras, α -actine du muscle lisse, etc) ou encore de promoteurs répondant à un stimulus (récepteur des hormones stéroïdes, récepteur de l'acide rétinoïque, etc). De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, tel que par exemple les promoteurs des gènes E1A et MLP d'adénovirus, le promoteur précoce du CMV, le promoteur du LTR du RSV, etc. En outre, ces régions promotrices peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation, de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique ou majoritaire.

Par ailleurs, l'acide nucléique peut également comporter une séquence signal dirigeant le produit synthétisé dans les voies de sécrétion de la cellule cible. Cette séquence signal peut être la séquence signal naturelle de l'apoA-I, mais il peut également s'agir de toute autre séquence signal fonctionnelle, ou d'une séquence signal artificielle.

L'acide nucléique selon l'invention peut être utilisé pour produire les variants d'ApoA-I recombinants par expression dans une cellule hôte recombinée, ou directement comme médicament dans des applications de thérapie génique ou cellulaire.

Pour la production de variants recombinants selon l'invention, l'acide nucléique est avantageusement incorporé à un vecteur plasmidique ou viral, qui peut être à répllication autonome ou intégratif. Ce vecteur est ensuite utilisé pour transfecter ou infecter une population cellulaire choisie. Les

5 cellules transfectées ou infectées ainsi obtenues sont alors cultivées dans des conditions permettant l'expression de l'acide nucléique, et le variant d'apoA-I recombinant selon l'invention est isolé. Les hôtes cellulaires utilisables pour la production des variants de l'invention par voie recombinante sont aussi bien des hôtes eucaryotes que procaryotes. Parmi

10 les hôtes eucaryotes qui conviennent, on peut citer les cellules animales, les levures, ou les champignons. En particulier, s'agissant de levures, on peut citer les levures du genre *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Schwanniomyces*, ou *Hansenula*. S'agissant de cellules animales, on peut citer les cellules COS, CHO, Cl27, NIH-3T3, etc. Parmi les champignons, on

15 peut citer plus particulièrement *Aspergillus* ssp. ou *Trichoderma* ssp. Comme hôtes procaryotes, on préfère utiliser les bactéries suivantes *E.coli*, *Bacillus*, ou *Streptomyces*. Le variant ainsi isolé peut être ensuite conditionné en vue de son utilisation thérapeutique.

Selon un mode particulièrement intéressant, l'acide nucléique selon

20 l'invention est utilisé directement à titre de médicament, dans des applications de thérapie génique ou cellulaire. A cet égard, il peut être utilisé tel quel, par injection au niveau du site à traiter ou incubation avec des cellules en vue de leur administration. Il a en effet été décrit que les acides nucléiques nus pouvaient pénétrer dans les cellules sans vecteur particulier.

25 Néanmoins, on préfère dans le cadre de la présente invention utiliser un vecteur d'administration, permettant d'améliorer (i) l'efficacité de la pénétration cellulaire, (ii) le ciblage (iii) la stabilité extra- et intracellulaires.

Selon un mode particulier, la présente invention concerne donc un vecteur comprenant un acide nucléique tel que défini ci-avant.

Différents types de vecteurs peuvent être utilisés. Il peut s'agir de vecteurs viraux ou non viraux.

Dans un mode préféré, le vecteur de l'invention est un vecteur viral.

L'utilisation de vecteurs viraux repose sur les propriétés naturelles de transfection des virus. Il est ainsi possible d'utiliser les adénovirus, les
5 herpès virus, les rétrovirus les virus adéno associés ou encore le virus de la vaccine. Ces vecteurs s'avèrent particulièrement performants sur le plan de la transfection.

S'agissant plus particulièrement d'adénovirus, différents sérotypes, dont la structure et les propriétés varient quelque peu, ont été caractérisés.
10 Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale (voir demande WO94/26914). Parmi les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente
15 invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV). De préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. De
20 préférence, on utilise dans le cadre de l'invention des adénovirus d'origine humaine ou canine ou mixte.

Préférentiellement, les adénovirus défectifs de l'invention comprennent les ITR, une séquence permettant l'encapsidation et l'acide nucléique d'intérêt. Encore plus préférentiellement, dans le génome des adénovirus de
25 l'invention, la région E1 au moins est non fonctionnelle. Le gène viral considéré peut être rendu non fonctionnel par toute technique connue de l'homme du métier, et notamment par suppression totale, substitution, délétion partielle, ou addition d'une ou plusieurs bases dans le ou les gènes

considérés. De telles modifications peuvent être obtenues in vitro (sur de l'ADN isolé) ou in situ, par exemple, au moyens des techniques du génie génétique, ou encore par traitement au moyen d'agents mutagènes. D'autres régions peuvent également être modifiées, et notamment la région E3
5 (WO95/02697), E2 (WO94/28938), E4 (WO94/28152, WO94/12649, WO95/02697) et L5 (WO95/02697). Selon un mode particulièrement préféré, on utilise dans le cadre de la présente invention un adénovirus recombinant présentant une délétion de tout ou partie des régions E1 et E4. Ce type de vecteur offre en effet des propriétés de sécurité particulièrement
10 avantageuses.

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par toute technique connue de l'homme du métier (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un
15 adénovirus et un plasmide portant entre autre l'acide nucléique ou la cassette de l'invention. La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits adénovirus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la
20 partie du génome de l'adénovirus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %). D'autres lignées ont
25 été décrites dans les demandes n° WO 94/26914 et WO95/02697.

Ensuite, les adénovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire, comme illustré dans les exemples.

Concernant les virus adéno-associés (AAV), il s'agit de virus à ADN de taille relativement réduite, qui s'intègrent dans le génome des cellules qu'ils infectent, de manière stable et site-spécifique. Ils sont capables d'infecter un large spectre de cellules, sans induire d'effet sur la croissance, la morphologie ou la différenciation cellulaires. Par ailleurs, ils ne semblent pas impliqués dans des pathologies chez l'homme. Le génome des AAV a été cloné, séquencé et caractérisé. Il comprend environ 4700 bases, et contient à chaque extrémité une région répétée inversée (ITR) de 145 bases environ, servant d'origine de réplication pour le virus. Le reste du génome est divisé en 2 régions essentielles portant les fonctions d'encapsidation : la partie gauche du génome, qui contient le gène rep impliqué dans la réplication virale et l'expression des gènes viraux; la partie droite du génome, qui contient le gène cap codant pour les protéines de capsid du virus.

L'utilisation de vecteurs dérivés des AAV pour le transfert de gènes in vitro et in vivo a été décrite dans la littérature (voir notamment WO 91/18088; WO 93/09239; US 4,797,368, US5,139,941, EP 488 528). Ces demandes décrivent différentes constructions dérivées des AAV, dans lesquelles les gènes rep et/ou cap sont délétés et remplacés par un gène d'intérêt, et leur utilisation pour transférer in vitro (sur cellules en culture) ou in vivo (directement dans un organisme) ledit gène d'intérêt. Les AAV recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés par co-transfection, dans un lignée cellulaire infectée par un virus auxiliaire humain (par exemple un adénovirus), d'un plasmide contenant l'acide nucléique ou la cassette de l'invention bordée de deux régions répétées inversées (ITR) d'AAV, et d'un plasmide portant les gènes d'encapsidation (gènes rep et cap) d'AAV. Les AAV recombinants produits sont ensuite purifiés par des techniques classiques (voir notamment WO95/06743).

Concernant les virus de l'herpès et les rétrovirus, la construction de vecteurs recombinants a été largement décrite dans la littérature : voir notamment Breakfield et al., New Biologist 3 (1991) 203; EP 453242,

EP178220, Bernstein et al. Genet. Eng. 7 (1985) 235; McCormick, BioTechnology 3 (1985) 689, etc. En particulier, les rétrovirus sont des virus intégratifs, infectant sélectivement les cellules en division. Ils constituent donc des vecteurs d'intérêt pour des applications cancer. Le génome des rétrovirus comprend essentiellement deux LTR, une séquence d'encapsidation et trois régions codantes (gag, pol et env). Dans les vecteurs recombinants dérivés des rétrovirus, les gènes gag, pol et env sont généralement délétés, en tout ou en partie, et remplacés par une séquence d'acide nucléique hétérologue d'intérêt. Ces vecteurs peuvent être réalisés à partir de différents types de rétrovirus tels que notamment le MoMuLV ("murine moloney leukemia virus"; encore désigné MoMLV), le MSV ("murine moloney sarcoma virus"), le HaSV ("harvey sarcoma virus"); le SNV ("spleen necrosis virus"); le RSV ("rous sarcoma virus") ou encore le virus de Friend.

Pour construire des rétrovirus recombinants comportant l'acide nucléique ou la cassette de l'invention, un plasmide comportant notamment les LTR, la séquence d'encapsidation et l'acide nucléique ou la cassette est construit, puis utilisé pour transfecter une lignée cellulaire dite d'encapsidation, capable d'apporter en trans les fonctions rétrovirales déficientes dans le plasmide. Généralement, les lignées d'encapsidation sont donc capables d'exprimer les gènes gag, pol et env. De telles lignées d'encapsidation ont été décrites dans l'art antérieur, et notamment la lignée PA317 (US4,861,719); la lignée PsiCRIP (WO90/02806) et la lignée GP+envAm-12 (WO89/07150). Par ailleurs, les rétrovirus recombinants peuvent comporter des modifications au niveau des LTR pour supprimer l'activité transcriptionnelle, ainsi que des séquences d'encapsidation étendues, comportant une partie du gène gag (Bender et al., J. Virol. 61 (1987) 1639). Les rétrovirus recombinants produits sont ensuite purifiés par des techniques classiques.

Pour la mise en oeuvre de la présente invention, il est tout particulièrement avantageux d'utiliser un adénovirus ou un rétrovirus

recombinant défectif. Ces vecteurs possèdent en effet des propriétés particulièrement intéressantes pour le transfert de gènes codant pour des apolipoprotéines. Les vecteurs adénoviraux selon l'invention sont particulièrement avantageux pour une administration directe in vivo d'une
5 suspension purifiée, ou pour la transformation ex vivo de cellules, notamment autologues, en vue de leur implantation. De plus, les vecteurs adénoviraux selon l'invention présentent en outre des avantages importants, tels que notamment leur très haute efficacité d'infection, permettant de réaliser des infections à partir de faibles volumes de suspension virale.

10 A cet égard, l'invention concerne préférentiellement un adénovirus recombinant défectif comprenant, inséré dans son génome, un ADN codant pour un variant de l'apolipoprotéine A-I tel que défini ci-avant.

Selon un autre mode particulièrement avantageux de mise en oeuvre de l'invention, on utilise une lignée productrice de vecteurs rétroviraux
15 contenant la séquence codant pour le variant de l'ApoA-I, pour une implantation in vivo. Les lignées utilisables à cet effet sont notamment les cellules PA317 (US4,861,719), PsiCrip (WO90/02806) et GP+envAm-12 (US5,278,056), modifiées pour permettre la production d'un rétrovirus contenant une séquence nucléique codant pour un variant de l'ApoA-I selon
20 l'invention.

Selon un autre aspect de l'invention, le vecteur utilisé est un vecteur chimique. Le vecteur selon l'invention peut en effet être un agent non viral capable de promouvoir le transfert et l'expression d'acides nucléiques dans des cellules eucaryotes. Les vecteurs chimiques ou biochimiques
25 représentent une alternative intéressante aux virus naturels en particulier pour des raisons de commodité, de sécurité et également par l'absence de limite théorique en ce qui concerne la taille de l'ADN à transférer.

Ces vecteurs synthétiques ont deux fonctions principales, compacter l'acide nucléique à transfecter et promouvoir sa fixation cellulaire ainsi que son passage à travers la membrane plasmique et, le cas échéant, les deux membranes nucléaires. Pour pallier à la nature polyanionique des acides nucléiques, les vecteurs non viraux possèdent tous des charges polycationiques.

Parmi les vecteurs synthétiques développés, les polymères cationiques de type polylysine, (LK₂LK)_n, (LK₂KL)_n, polyéthylène imine et DEAE dextran ou encore les lipides cationiques ou lipofectants sont les plus avantageux. Ils possèdent la propriété de condenser l'ADN et de promouvoir son association avec la membrane cellulaire. Parmi ces derniers, on peut citer les lipopolyamines (lipofectamine, transfectam, etc) et différents lipides cationiques ou neutres (DOTMA, DOGS, DOPE, etc). Plus récemment, il a été développé le concept de la transfection ciblée, médiée par un récepteur, qui met à profit le principe de condenser l'ADN grâce au polymère cationique tout en dirigeant la fixation du complexe à la membrane grâce à un couplage chimique entre le polymère cationique et le ligand d'un récepteur membranaire, présent à la surface du type cellulaire que l'on veut greffer. Le ciblage du récepteur à la transferrine, à l'insuline ou du récepteur des asialoglycoprotéines des hépatocytes a ainsi été décrit.

L'invention concerne également toute cellule modifiée génétiquement par insertion d'un acide nucléique codant pour un variant de l'apolipoprotéine A-I tel que défini précédemment. Il s'agit avantageusement de cellules mammifères, susceptibles d'être administrées ou implantées in vivo. Il peut s'agir en particulier de fibroblastes, myoblastes, hépatocytes, kératinocytes, cellules endothéliales, épithéliales, gliales, etc. Les cellules sont préférentiellement d'origine humaine. De manière particulièrement avantageuse, il s'agit de cellules autologues, c'est-à-dire prélevée à partir d'un patient, modifiées ex vivo par un acide nucléique selon l'invention en

vue de leur conférer des propriétés thérapeutiques, puis réadministrées au patient.

Les cellules selon l'invention peuvent être issues de cultures primaires. Celles-ci peuvent être prélevées par toute technique connue de l'homme du métier, puis mises en culture dans des conditions permettant leur prolifération. S'agissant plus particulièrement de fibroblastes, ceux-ci peuvent être aisément obtenus à partir de biopsies, par exemple selon la technique décrite par Ham [Methods Cell.Biol. 21a (1980) 255]. Ces cellules peuvent être utilisées directement pour l'insertion de l'acide nucléique de l'invention (au moyen d'un vecteur viral ou chimique), ou conservées, par exemple par congélation, pour l'établissement de banques autologues, en vue d'une utilisation ultérieure. Les cellules selon l'invention peuvent également être des cultures secondaires, obtenues par exemple à partir de banques préétablies (voir par exemple EP 228458, EP 289034, EP 400047, EP 456640).

Les cellules en culture peuvent en particulier être infectées par les virus recombinants de l'invention pour leur conférer la capacité de produire un variant de l'apoA-I biologiquement actif. L'infection est réalisée in vitro selon des techniques connues de l'homme du métier. En particulier, selon le type de cellules utilisé et le nombre de copies de virus par cellule désiré, l'homme du métier peut adapter la multiplicité d'infection et éventuellement le nombre de cycles d'infection réalisé. Il est bien entendu que ces étapes doivent être effectuées dans des conditions de stérilité appropriées lorsque les cellules sont destinées à une administration in vivo. Les doses de virus recombinant utilisées pour l'infection des cellules peuvent être adaptées par l'homme du métier selon le but recherché. Les conditions décrites ci-avant pour l'administration in vivo peuvent être appliquées à l'infection in vitro. Pour l'infection par des rétrovirus, il est également possible de co-cultiver les cellules que l'on désire infecter avec des cellules productrices des rétrovirus

recombinants selon l'invention. Ceci permet de s'affranchir de la purification des rétrovirus.

Un autre objet de l'invention concerne un implant comprenant des cellules de mammifères génétiquement modifiées par insertion d'un acide nucléique tel que défini ci-avant, et une matrice extracellulaire. Préférentiellement, les implants selon l'invention comprennent 10^5 à 10^{10} cellules. Plus préférentiellement, ils en comprennent 10^6 à 10^8 . Les cellules peuvent également être des cellules productrices de virus recombinants contenant inséré dans leur génome un acide nucléique tel que défini ci-avant.

Plus particulièrement, dans les implants de l'invention, la matrice extracellulaire comprend un composé gélifiant et éventuellement un support permettant l'ancrage des cellules.

Pour la préparation des implants selon l'invention, différents types de gélifiants peuvent être employés. Les gélifiants sont utilisés pour l'inclusion des cellules dans une matrice ayant la constitution d'un gel, et pour favoriser l'ancrage des cellules sur le support, le cas échéant. Différents agents d'adhésion cellulaire peuvent donc être utilisés comme gélifiants, tels que notamment le collagène, la gélatine, les glycosaminoglycans, la fibronectine, les lectines, etc. De préférence, on utilise dans le cadre de la présente invention du collagène. Il peut s'agir de collagène d'origine humaine, bovine ou murine. Plus préférentiellement, on utilise du collagène de type I.

Comme indiqué ci-avant, les compositions selon l'invention comprennent avantageusement un support permettant l'ancrage des cellules. Le terme ancrage désigne toute forme d'interaction biologique et/ou chimique et/ou physique entraînant l'adhésion et/ou la fixation des cellules sur le support. Par ailleurs, les cellules peuvent soit recouvrir le support utilisé, soit pénétrer à l'intérieur de ce support, soit les deux. On préfère utiliser dans le

cadre de l'invention un support solide, non toxique et/ou bio-compatible. En particulier, on peut utiliser des fibres de polytétrafluoroéthylène (PTFE) ou un support d'origine biologique (corail, os, collagène, etc).

5 Les implants selon l'invention peuvent être implantés en différents sites de l'organisme. En particulier, l'implantation peut être effectuée au niveau de la cavité péritonéale, dans le tissu sous-cutané (région sus-pubienne, fosses iliaques ou inguinales, etc), dans un organe, un muscle, une tumeur, le système nerveux central, ou encore sous une muqueuse. Les implants selon l'invention sont particulièrement avantageux en ce sens qu'ils
10 permettent de contrôler la libération du variant d'apoA-I dans l'organisme : Celle-ci est tout d'abord déterminée par la multiplicité d'infection et par le nombre de cellules implantées. Ensuite, la libération peut être contrôlée soit par le retrait de l'implant, ce qui arrête définitivement le traitement, soit par l'utilisation de systèmes d'expression régulables, permettant d'induire ou de
15 réprimer l'expression des gènes thérapeutiques.

En raison des propriétés anti-athérogènes particulièrement remarquables des variants de l'invention, les acides nucléiques constituent ainsi un nouveau médicament dans le traitement et la prévention des pathologies cardiovasculaires (athérosclérose, resténose, etc).

20 L'invention concerne à cet effet tout composition pharmaceutique comprenant un variant de l'apolipoprotéine A-I et/ou un acide nucléique et/ou un vecteur et/ou une cellule génétiquement modifiée tels que décrits ci-avant.

25 La présente invention offre ainsi un nouveau moyen pour le traitement ou la prévention des pathologies liées aux dyslipoprotéïnémies, en particulier dans le domaine des affections cardiovasculaires comme l'infarctus du myocarde, l'angor, la mort subite, la resténose, la décompensation cardiaque et les accidents cérébro-vasculaires. Plus généralement, cette approche

offre un moyen d'intervention thérapeutique très prometteur pour chaque cas où un déficit d'ordre génétique ou métabolique de l'apolipoprotéine A-I peut être corrigé.

La présente invention sera décrite plus en détail à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Liste des figures

Fig 1 : Carte de restriction du plasmide PXL2116

Fig 2 : Construction du phage M 13 portant l'exon 4 du patient.

Fig 3 : Construction du vecteur portant PXL2116 muté.

Fig 4 : Etudes de turbidimétrie en fonction de la température.

Fig 5 : Profils de gel filtration.

Fig 6 : Fluorescence des tryptophanes et concentration en phospholipides par fraction pour les différents complexes.

Exemples

Exemple 1 - Mise en évidence d'un variant ApoA-I

Le variant ApoA-I Paris a été identifié et isolé à partir d'un patient sélectionné en raison de son bilan lipidique particulier. Plus précisément, le patient présentait le bilan lipidique suivant (nature du prélèvement : sérum).

			Normales
20	Cholestérol total	4.59 mmol/l	4.54-6.97
	Triglycérides	2.82 mmol/l	0.74-1.71
	HDL-cholestérol	0.25 mmol/l	0.88-1.60
	LDL-cholestérol	3.06 mmol/l	2.79-4.85

: Liste des figures

Fig 1 : Carte de restriction du plasmide PXL2116

Fig 2 : Construction du phage M 13 portant l'exon 4 du patient.

Fig 3 : Construction du vecteur portant PXL2116 muté.

Fig 4 : Etudes de turbidimétrie en fonction de la température.

4a: turbidimetrie de l'association de différentes ApoAI et de DPMC en absence de GndHCl (-■- : témoin ; -◆- : recombinante ; -◇- : plasmatique ; -□- : Paris.).

4b: turbidimetrie de l'association de différentes ApoAI et de DPMC en présence de GndHCl (-■- : témoin ; -◆- : recombinante ; -◇- : plasmatique ; -□- : Paris.).

4c: turbidimetrie de l'association de l'ApoAI Paris et de DPMC (-■- : en absence de GndHCl ; -□- : en présence de GndHCl (0.5M)).

4d: turbidimetrie de l'association de l'ApoAI recombinante et de DPMC (-■- : en absence de GndHCl ; -□- : en présence de GndHCl (0.5M)).

4e: turbidimetrie de l'association de l'ApoAI plasmatique et de DPMC (-■- : en absence de GndHCl ; -□- : en présence de GndHCl (0.5M)).

4f : effet de GndHCl (0.5M) sur l'association ApoAI / DPMC (-■- : en absence de GndHCl ; -□- : en présence de GndHCl)

Fig 5 : fluorescence relative des fractions de Superose 6 PG.(-■- : POPC/AI Paris ; -□- : POPC/AI recombinante ; -◆- POPC/AI plasmatique.)

Fig 6 : 6a : Fluorescence des tryptophanes et concentration en phospholipides pour le complexe POPC/AI Paris (-■- : fluorescence relative ; -□- : phospholipides).

6b : Fluorescence des tryptophanes et concentration en phospholipides pour le complexe POPC/AI recombinante(-■- : fluorescence relative ; -□- : phospholipides).

Apolipoprotéine A-I	0.50 g/l	1.20-2.15
---------------------	----------	-----------

Apolipoprotéine B	1.38 g/l	0.55-1.30
-------------------	----------	-----------

Phenotype apoE: 3/3

De manière inattendue, ce patient ne présentait aucun signe
5 d'athérosclérose malgré une concentration d'HDL extrêmement faible et une
hypertriglycémie. Ceci a conduit les demandeurs à rechercher l'origine
de cette protection.

Isolement des HDL contenant l'apoA-I Paris à partir du plasma.

Après une nuit à jeun, du sang est prélevé chez les sujets portant le
10 gène de l'apoA-I Paris. Le plasma est préparé par centrifugation lente du
sang à 4°C (2000 g, 30 minutes). Les lipoprotéines de haute densité sont
préparées par ultracentrifugation séquentielle à la densité de 1.063-1.21 g/ml
(Havel, J. Clin. Invest. 34: 1345-54, 1955). La fraction contenant les HDL est
15 ensuite dialysée contre du tampon Tris-HCl 10 mM, azide de sodium 0,01%,
au pH 7,4.

Mise en évidence des dimères d'apoA-I Paris.

La fraction HDL dialysée est délipidée dans un mélange diethylether/
ethanol (3/1, v/v) et la concentration de protéines est estimée par la méthode
de Lowry (Lowry et al., J. Biol. Chem., 193:265-75, 1951). Les protéines de
20 la fraction HDL subissent une migration sur un gel de polyacrylamide en
présence de SDS en condition non réductrice. Cette migration permet de
mettre en évidence la taille des différentes protéines des HDL du patient.
Outre la présence des protéines correspondantes aux apoA-I et apoA-II de
tailles normales, cette analyse révèle la présence de protéines de plus hauts
25 poids moléculaires correspondant à des dimères d'apoA-I et des complexes
apoA-I et apoA-II. La présence des apoA-I et apoA-II dans ces complexes a
été vérifiée par une révélation immunologique spécifique.

Mise en évidence de la différence de charge de l'apoA-I mutée

La détection de l'apoA-I mutée directement à partir du plasma a été réalisée selon le protocole suivant (Menzel, H. J., and Utermann, G., Electroforesis, 7: 492-495, 1986): vingt microlitres de plasma sont délipidés
5 toute une nuit avec le mélange éthanol/ether et resuspendu dans un tampon de dépôt. Un aliquot de 5 µl subit une électrophorèse sur un gel de focusing isoelectrique (pH 4-6,5, Pharmolyte), et les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nylon. Les bandes correspondantes à l'apoA-I sont détectées par une réaction immunologique à l'aide d'anticorps
10 anti-apoA-I humaine.

La détection de l'apoA-I mutée peut se faire aussi à partir des protéines HDL. La fraction HDL dialysée est délipidée dans un mélange diethylether/ ethanol (3/1, v/v) et la concentration de protéines est estimée par la méthode de Lowry (Lowry et al., J. Biol. Chem., 193:265-75, 1951).
15 Environ 100 µg de protéines subissent une électrophorèse sur un gel de focusing isoelectrique (pH 4-6,5, Pharmolyte), et les protéines sont ensuite révélées par coloration au bleu de Coomassie. Cette technique permet de mettre en évidence que les isoformes les plus importantes des apoA-I du patient ayant la mutation sont déplacées vers l'anode, ce qui correspond à
20 une différence de charge de -1 par rapport à la charge d'apoA-I normale.

Exemple 2 - Identification du gène et de la mutation

L'ADN génomique du patient a été isolé du sang total selon la technique de Madisen et al. (Amer. J. Med. Genet, 27: 379-390, 1987). Le gène de l'apoA-I a ensuite été amplifié par la technique de PCR. A cet effet,
25 les réactions d'amplification ont été réalisées sur 1 µg d'ADN génomique purifié introduit dans le mélange suivant :

- 10 µl de tampon 10X (100 mM Tris-HCl pH 8,3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl₂; 0,1% (w/v) gélatine)

- 10 µl de dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) 2mM
- 20 pmol de chaque amorce
- 2,5 U de Taq polymérase (Perkin-Elmer)
- qsp 100 µl H₂O.

5 Les amorces utilisées pour l'amplification sont les suivantes :

Sq5490 : 5'-AAGGCACCCCACTCAGCCAGG-3' (SEQ ID n° 3)

Sq5491 : 5'-TTCAACATCATCCCACAGGCCTCT-3' (SEQ ID n° 4)

Sq5492 : 5'-CTGATAGGCTGGGGCGCTGG-3' (SEQ ID n° 5)

Sq5493 : 5'-CGCCTCACTGGGTGTTGAGC-3' (SEQ ID n° 6)

10 Les amorces Sq5490 et Sq5491 amplifient un fragment de 508 pb correspondant aux exons 2 et 3 du gène de l'apoA-I et les amorces Sq5492 et Sq5493 amplifient un fragment de 664 pb correspondant à l'exon 4 de ce gène.

15 Les produits d'amplification (deux fragments PCR de 508 et 664 pb) ont ensuite été séquencés. Pour cela, une première méthode a été utilisée, consistant à séquencer directement en utilisant le kit de séquençage de fragments PCR (Amersham). Les amorces utilisées pour le séquençage sont les amorces PCR, mais il peut également s'agir d'amorces internes aux fragments (Cf amorces S4, S6 et S8 ci-dessous).

20 Une deuxième technique de séquençage a également été mise en oeuvre qui a consisté à cloner les fragments PCR dans un vecteur M13 mp28. L'ADN double brin du M13 a été clivé par EcoRV puis déphosphorylé. les fragment PCR ont été traités à la Klenow, phosphorylés et ligués au vecteur M13. Les plages blanches ont ensuite été prélevées et l'ADN simple

brin amplifié puis purifié sur le Catalyst (Applied Biosystem) a été séquencé par une amorce -20 fluorescente (Kit PRISM dye primer et protocole n° 401386, Applied Biosystem) ou par des amorces internes aux fragments après orientations de ceux-ci. La technique des didéoxynucléotides
5 fluorescent est alors utilisée (Kit DyeDeoxyTerminator et protocole n° 401388, Applied Biosystem)

S8 5' -TGG GAT CGA GTG AAG GAC CTG- 3' (SEQ ID n° 7)

S4 5' -CGC CAG AAG CTG CAC CAG CTG- 3' (SEQ ID n° 8)

S6 5' -GCG CTG GCG CAG CTC GTC GCT- 3' (SEQ ID n° 9)

10 Les séquences issues de plusieurs clones ont ensuite été compilées et comparées à la séquence de l'ApoA1. La séquence des acides aminé 148 à 154 de l'ApoA1 mature est donnée ci dessous (correspondant aux résidus 172-178 sur la séquence SEQ ID n° 1).

15 ATG CGC GAC CGC GCG CGC GCC
Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala
151

Une mutation C->T en première base du codon codant pour l'aa 151 qui code alors pour une cystéine (cf séquence SEQ ID n° 2 ci-dessous) a été
20 retrouvée dans une partie des clones séquencés. Cette mutation est donc présente à l'état hétérozygote chez le patient sélectionné.

ATG CGC GAC TGC GCG CGC GCC
Met Arg Asp Cys Ala Arg Ala
151

25 L'ensemble du cDNA codant pour le variant apoA-I Paris selon l'invention a été séquencé. Une partie de cette séquence est présentée sur la SEQ ID n° 10.

Exemple 3 : Construction d'un vecteur d'expression plasmidique (pXL2116mute)

L'apoA1 Paris presente une mutation ponctuelle situee sur la sequence de l'exon 4 du gene de l'apoA1 du patient. La strategie de construction du vecteur d'expression consiste a substituer, dans un vecteur d'expression de l'apoA1 (le vecteur pXL2116, figure 1) la region correspondant a l'exon 4 provenant du gene du patient.

3.1. Utilisation de l'exon 4 du patient cloné dans M13

L'exon 4 a été produit par PCR à partir de l'ADN purifié des cellules du patient et inséré au niveau du site EcoRV du polylinker du phage M13mp28 (figure 2).

Une mutagenèse par remplacement d'un fragment de l'apo A1 par un fragment issu de M13 portant la mutation est envisagée. Il nous reste donc à choisir les enzymes appropriées aux deux vecteurs de manière à ce qu'elles génèrent des extrémités cohésives pour le vecteur issu de pXL2116 digéré et pour l'insert issu de M13 double brin digéré.

3.2. Choix des enzymes de restriction

- Bsu361 possède dans M13 et dans pXL2116 un site unique de restriction en amont de la mutation.
- La digestion par BamHI, possédant un site de restriction unique à l'extrémité 3' de l'apo A1 du fait de la technique de clonage, et possédant un site de restriction dans le polylinker de M13, nous permet :

1) une ligation du vecteur provenant de pXL2116 et de l'insert provenant de M13

2) et ce en incorporant un fragment de polylinker qui nous sera utile pour vérifier par digestion enzymatique l'insertion du fragment muté provenant de M13.

Il est à noter que la présence de ce fragment de polylinker n'altère en rien la séquence codante de l'apo A1 puisque celui-ci est situé après le codon stop.

Le polypeptide riche en histidine dont la séquence nucléotidique a été clonée en 5' de l'apo A1 sera donc aussi synthétisé.

3.3. Construction du vecteur (figure 3).

10 - Le M13 rendu double brin est digéré par Bsu361/BamHI et le produit de la digestion est déposé sur gel. L'insert ainsi généré est récupéré en quantité suffisante et présente bien une taille de 1Db.

- Le pXL2116 est digéré par les mêmes enzymes mais non purifié.

De façon à éviter la religation des produits de la digestion, une digestion est effectuée par XhoI qui reconnaît deux sites de restriction à l'intérieur du fragment Bsu361/BamHI.

En effet, une déphosphorylation a été d'abord tentée mais a donné de très mauvais résultats sur boîte et aucun clone positif sur 24 testés.

Les quantités de vecteur et d'insert optimales pour la ligation ont été évaluées à 50ng de vecteur pour 15ng d'insert.

Les souches DH5a sont transformées avec les produits des trois ligations suivantes :

- vecteur digéré par Bsu361 et BamHI sans ligase (témoin négatif de ligation)

- produit de la digestion + ligase

- produit de la digestion + insert + ligase

Les cellules compétentes sont aussi transformées avec le pUC19 afin de tester l'efficacité de la transformation.

- 5 Les résultats des cellules transformées sur boîte de milieu LB Chloramphénicol (sélection des souches BL21) Ampicilline (sélection des souches ayant intégré le plasmide) sont reproduits ci-dessous.

RESULTATS OBTENUS SUR BOITE DE PETRI

TRANSFORMATION DH5a+	RESULTATS	INTERPRETATION
pUC19	200 clones	Témoin de transformation
vecteur (+fragment)	0 clone	Digestion parfaite, pas de plasmide recircularisé
vecteur (+fragment) + ligase	160 clones	Bruit de fond très important : stratégie de digestion supplémentaire peu efficace
vecteur (+fragment) + ligase + insert	120 clones	« Effet de diminution » de la ligase souvent constaté. Les bactéries ne sont pas obligatoirement transformées avec une séquence mutée correcte

48 clones sont réisolés à partir de la boîte 4.

- 10 De manière à repérer les clones positifs (c'est-à-dire ayant inséré le fragment muté de M13), l'ADN plasmidique obtenu par purification sur chacun des 48 clones est digéré par l'enzyme NdeI.

Si l'insert provenant de M13 a bien été inséré, on verra sur gel deux fragments : une de 4,5kb et un de 1kb.

- 15 Si un autre évènement de ligation s'est produit, on obtiendra soit plusieurs bandes, soit simplement un plasmide linéarisé (cas général).

D'après le résultat du gel, les clones 7,8,13,16,26 semblent être corrects. On sélectionne le clone qui donne un résultat net.

De manière à vérifier totalement la séquence du clone sélectionné, on procède à six digestions enzymatiques.

5 La présence du polylinker donc de l'insert est ainsi vérifiée mais l'évènement de ligation doit être aussi vérifié.

De toute évidence, la ligation est celle attendue puisque la taille du plasmide est correcte, c'est-à-dire égale à celle du pXL2116.

10 Sauf évènement de mutation très rare, la séquence de l'apoAI nouvellement clonée devrait être exacte.

Le clone 8 porte donc le plasmide px12116 muté correctement.

Exemple 4 : Expression de variants apoAI recombinants

15 Cet exemple décrit un procédé de production de variants apoAI recombinants. Ce procédé a été réalisé dans une bactérie. D'autres systèmes d'expression sont utilisables à cet effet (levures, cellules animales, etc).

4.1. Principe

20 L'expression du plasmide au sein de la bactérie a été placée sous le contrôle des promoteur et terminateur T7. L'isopropyl-b-thiogalactopyranoside (IPTG), inducteur de l'opéron lactose, induit dans ce système la synthèse de l'ARN polymérase T7 qui se fixe ensuite spécifiquement sur le promoteur T7 et démarre la transcription du gène de la protéine recombinante. L'ARN polymérase est stoppée par le terminateur T7, ce qui évite que le flux transcriptionnel ne déborde en aval de la séquence
25 d'intérêt.

La rifampicine est un antibiotique inhibant l'activité ARN polymérase endogène d'E.coli . Elle inhibe donc la synthèse des protéines bactériennes, c'est-à-dire à la fois des protéases, ce qui limite les dégradations de la protéine d'intérêt; et des protéines bactériennes contaminantes, ce qui
5 amplifie l'expression de la protéine d'intérêt.

4.2. Protocole

La souche utilisée pour l'expression est Escherichia coli BL21 DE3 pLys S. L'ADN plasmidique est introduit dans E. coli par transformation selon les techniques classiques. La culture est conservée sous forme de
10 suspension congelée à - 20°C, en présence de 25% de glycérol, et aliquotée par fractions de 500 µl.

Une préculture est initiée par l'addition de quelques gouttes de suspension congelée dans 10 ml de milieu M9 ampicilline, puis incubée sur la nuit à 37°C. Les erlens de 1 litre sontensemencés à partir de la
15 préculture et placés dans un shaker à 37°C jusqu'à obtenir une DO comprise entre 0,5 et 1 à 610 nm. L'IPTG (Bachem ref Q-1280) est alors ajouté à une concentration finale de 1 mM. Après 15 minutes d'incubation à 37°C, la rifampicine (Sigma) est ajoutée à une concentration finale de 100 µg/ml. Puis, après 1 heure de culture, les cellules sont récupérées par
20 centrifugation (15 minutes, 8000 rpm) et l'expression est vérifiée par électrophorèse en conditions dénaturantes sur un gel d'acrylamide à 15% et par immunoblot.

Les resultats obtenus montrent que la proteine mutée s'exprime selon un bon taux d'expression et que celle-ci est effectivement revelee par les
25 anticorps polyclonaux anti-apoA1.

Exemple 5 : Purification des variants apoA1 recombinants.

Cet exemple décrit une méthode efficace permettant de purifier les variants apoA1 recombinants selon l'invention. Il est entendu que d'autres procédés peuvent être utilisés.

Les protéines étant exprimées dans le cytoplasme d'E. coli, leur
5 extraction nécessite, dans un premier temps, d'effectuer une lyse cellulaire suivie d'une élimination des acides nucléiques.

5.1. Lyse bactérienne

Après centrifugation de la culture, le culot bactérien est resuspendu sous agitation douce dans du tampon de lyse en présence d'inhibiteurs de
10 protéases et de β -mercaptoéthanol.

Le β -mercaptoéthanol est un réducteur clivant les ponts disulfure formés entre deux résidus cystéine. Il ne se forme aucun pont disulfure dans le cytoplasme de E.coli, la présence d'un agent réducteur s'avère toutefois nécessaire une fois les protéines extraites. En effet l'addition de β
15 mercaptoéthanol dans le tampon de lyse permet d'éviter la formation de ponts entre les résidus cystéine des protéines bactériennes et ceux des protéines recombinantes.

La lyse cellulaire est obtenue par 3 fois 5 minutes de sonication dans la glace (Vibracells sonics material, mode pulsed, output control 5), elle est
20 suivie par une centrifugation à 10000 rpm (1 heure, 4°C sur Beckman J2-21 M/E, rotor JA10) permettant d'éliminer les débris cellulaires. Un dosage protéique est réalisé sur le surnageant par la méthode colorimétrique de Bradford.

5.2. Précipitation des acides nucléiques

25 Elle est réalisée sur le surnageant de lyse par une solution de sulfate de streptomycine à 10%, à raison de 10 ml pour 10 g de protéines, sous

agitation magnétique douce 1 heure à 4°C. Les acides nucléiques sont éliminés par centrifugation à 10000 rpm (1 heure, 4°C sur Beckman J2-21 M/E, rotor JA10), et la concentration en protéines du surnageant est évaluée par dosage colorimétrique.

- 5 A l'issu de ces deux étapes on obtient une solution protéique de concentration connue regroupant l'ensemble des protéines intracellulaires dont la protéine d'intérêt. Celle-ci est purifiée par des techniques chromatographiques.

--> Chromatographie par filtration sur gel

- 10 --> Chromatographie d'affinité

5.3. Chromatographie par filtration sur gel

- 15 Le but de cette étape est l'élimination de l'EDTA, molécule interférant avec les conditions requises pour la chromatographie d'affinité. Pour cela le support Tris-acryl GF 05 (Sepracor) a été retenu. Ce gel permet la
séparation des molécules dont la Masse Moléculaire (MM) est comprise entre 300 et 2500 daltons, et l'exclusion des molécules de MM supérieure à 2500 daltons, dont les protéines. Ce gel présente d'autre part l'intérêt de posséder une bonne résistance à la pression, ce qui permet de travailler à débit élevé sans modifier la résolution. La chromatographie du lysat
20 bactérien est réalisée en tampon phosphate pH8. La concentration protéique dans le volume d'exclusion est déterminée, et éventuellement ajustée à 4 mg/ml par dilution dans le tampon phosphate pH8.

- 25 Cette étape peut être remplacée par une dialyse contre 2 X 10 litres de PBS. La solution protéique est ensuite mise en présence d'Hecameg 25 mM, ce détergent favorisant l'étape suivante de purification par diminution des interactions protéine-protéine.

5.4. Chromatographie d'affinité

Principe

La présence de 6 résidus histidine consécutifs associés à la protéine recombinante lui confère une affinité particulièrement élevée pour les ions nickel (Ni^{2+}) (15). Ces ions Ni^{2+} sont fixés à une matrice d'agarose par l'intermédiaire de l'Acide Nitrilo Acétique (NTA). Entre l'imidazole des histidine et les ions nickel se produit une liaison de chélation métallique; cette liaison est plus forte qu'une liaison ionique et moins forte qu'une liaison covalente.

Protocole

10 La capacité de fixation du gel NiNTA agarose (Qiagen) est de 2 mg de protéine pour 1 ml de gel. Ce gel est équilibré dans du tampon pH8 additionné d'Hecameg 25 mM. Les protéines bactériennes contaminantes sont non retenues à pH8, ou éliminées à pH6, et la protéine d'intérêt est récupérée à pH5. Ces étapes sont réalisées en présence d'hecameg 25 mM.

15 Les fractions (2 ml) éluées à pH5 sont additionnées de:

60 μl de NaOH 1M (neutralisation)

10 μl de PMSF 0,2M

40 μl d'EDTA 0,1M

20 Les fractions sont réunies en fonction de la concentration et de la pureté de la protéine élue. Ces caractéristiques sont analysées par électrophorèse (PAGE-SDS 15%).

L'élution à pH5 décroche la protéine associée au nickel en agissant sur la liaison Ni^{2+} - NTA. Il est donc nécessaire de dissocier ce cation de la protéine recombinante. Cette étape est effectuée par compétition grâce à

une incubation sous agitation magnétique douce à 4°C pendant 1 heure en présence d'histidine 50 mM.

5.5. Dialyses

Elles permettent d'éliminer l'histidine et le nickel. L'échantillon est
5 dialysé (membrane Spectra/Por MWCO 12-14000 daltons) à 4°C pendant 5 heures puis sur la nuit, contre 2 fois 10 litres de tampon PBS EDTA 2 mM. Un dosage de protéine est finalement effectué.

Ce procédé permet d'obtenir la protéine apoA-I Paris sous forme purifiée, essentiellement dépourvue de protéines contaminantes.

10 Exemple 6 : Propriétés physico-chimiques des apoA-I Paris et apoA-I normale recombinantes.

6.1. Mesures de turbidimétrie

6.1.1. Turbidimétrie en fonction de la température

La mesure de l'absorbance des vésicules DMPC à 325 nm en
15 présence d'apoA-I est une mesure de la formation de complexes protéolipidiques discoïdal de petites tailles. L'analyse de variation de température entre 19-28°C nous montre une diminution de l'absorbance autour de la température de transition des phospholipides (23°C), témoin de la formation des complexes. La figure 4 (en présence ou non de GdnHDL
20 pour éviter la formation de dimères) montre la comparaison de la formation de ces complexes avec les apoA-I normale et apoA-I Paris recombinantes, ainsi que de l'apoA-I native. Ces trois protéines ont des comportements assez proches mais avec pour l'apoA-I Paris, on note une tendance à s'associer avec elle-même pour former des dimères.

25 6.1.2. Turbidimétrie en fonction du temps

La baisse de turbidimétrie des vésicules de DMPC après incubation des apoA-I a été suivie à température donnée en fonction du temps en présence ou non de GdnHDL. La constante du temps ($1/t_{1/2}$ qui correspond à 50% de baisse de la turbidimétrie initiale) est évaluée en fonction de $1/T$ (température en Kelvin). La vitesse d'association est rapide pour l'apoA-I native, plus faible pour les apoA-I recombinantes, notamment l'apoA-I Paris. Par ailleurs, l'addition de GdnHDL augmente l'association protéine -lipides. Ceci de façon très importante pour les apoA-I recombinantes, notamment l'apoA-I Paris.

6.2. Spectre d'émission de fluorescence des tryptophanes

Le spectre d'émission de fluorescence des tryptophanes dans les différentes apoA-I a été mesuré aux longueurs d'ondes entre 300 et 400 nm (excitation à 295 nm). Les maximums d'émission sont indiqués à la Table 1 ci-dessous pour les apoA-I et pour les complexes apoA-I/cholestérol/POPC. Les maximums d'émission de fluorescence des tryptophanes dans les différentes apoA-I et complexes sont identiques indiquant que les tryptophanes sont dans le même environnement dans les trois protéines.

Table 1

Produit	Maximum d'émission
AI Paris	335
POPC/C/AI Paris	332
AI recombinante	334
POPC/C/AI rec	332
AI plasma	336
POPC/C/AI plasma	333

6.3. Isolation et caractérisation des complexes apoA-I/lipides

Des complexes avec l'apoA-I et du POPC ont été préparés par la technique au cholate. Les complexes ont été séparés des apoA-I libres par chromatographie de gel filtration sur une colonne Superose 6PG et leurs compositions analysées. Les profils de gel filtrations sont indiqués sur la figure 5. Un seul pic homogène est obtenu pour les complexes faits avec l'apoA-I native tandis qu'avec les apoA-I recombinantes, des populations hétérogènes sont observées. Les apoA-I libres sont éluées dans les fractions 20 à 24. Les concentrations en phospholipides et la fluorescence des tryptophanes par fractions pour les différents complexes sont indiqués sur la figure 6.

Exemple 7 - Construction d'un vecteur adénoviral pour l'expression de l'ApoAI mutée

Un ADNc codant pour un variant selon l'invention contenant la mutation Arg -> Cys en position 151 de l'ApoAI mature est obtenu par PCR. Les amorces

Alm1 : ATC GAT ACC GCC ATG AAA GCT GCG GTG CTG (SEQ ID n° 11),

Alm2 : ATG GGC GCG CGC GCA GTC GCG CAT CTC CTC (SEQ ID n° 12),

Alm3 : GAG GAG ATG CGC GAC TGC GCG CGC GCC CAT (SEQ ID n° 13)

et Alm4 : GTC GAC GGC GCC TCA CTG GGT GTT GAG CTT (SEQ ID n° 14)

sont utilisées. les amorces Alm1 et Alm4 introduisent respectivement des sites ClaI en 5' et Sall en 3' de l'ADNc tandis que les amorces Alm2 et

Alm3 qui sont complémentaires introduisent la mutation. Des réactions PCR avec les couples d'amorces Alm1-Alm2 et Alm3-Alm4 sont d'abord pratiqués sur un ADNc de l'ApoA1 non muté. Les fragments issus de ces PCR sont ensuite réintroduits dans une troisième PCR en présence des amorces Alm1 et Alm4, ce qui génère un fragment de 822pb qui est ensuite cloné dans pCRII (Invitrogen) pour vérification de sa séquence. Le fragment ClaI /Sall qui contient l'ADNc muté est ensuite introduit par les même sites de restriction dans le vecteur navette pXL-RSV-LPL qui contient l'ADNc de la LPL sous contrôle d'un promoteur LTR-RSV et avec un site de polyadénylation de l'hormone de croissance bovine, ensubstitution de l'ADNc de la LPL (FR9406759). Tout autre vecteur navette peut bien évidemment être utilisé. Le vecteur résultant est ensuite linéarisé et cotransfecté dans 293 pour l'obtention d'adénovirus recombinants. Les adénovirus ainsi obtenus peuvent être amplifiés sur plages, purifiés (notamment par chlorure de césium) puis conservés congelés, par exemple dans du glycérol. Pour leur utilisation thérapeutique, ils peuvent être associés à tout véhicule pharmaceutiquement acceptable. Il peut s'agir en particulier de solutions salines (phosphate monosodique, disodique, chlorure de sodium, potassium, calcium ou magnésium, etc, ou des mélanges de tels sels), stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables. Dans leur utilisation pour le traitement des pathologies liées aux dyslipoprotéïnémies, les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être administrés selon différents modes, et notamment par injection intraveineuse. Préférentiellement, ils sont injectés au niveau de la veine porte. Les doses de virus utilisées pour l'injection peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de la pathologie concernée ou encore de la durée du traitement recherchée. D'une manière générale, les virus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml. Pour les AAV et les

adénovirus, des doses de 10^6 à 10^{10} pfu/ml peuvent également être utilisées. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir infectieux d'une suspension de virions, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 48 heures, du
5 nombre de plages de cellules infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

LISTE DE SEQUENCES

- (1) INFORMATIONS GENERALES:
- 5 (i) DEPOSANT:
 (A) NOM: RHONE-POULENC RORER S.A.
 (B) RUE: 20, avenue Raymond ARON
 (C) VILLE: ANTONY
 10 (E) PAYS: FRANCE
 (F) CODE POSTAL: 92165
- (i) DEPOSANT:
 15 (A) NOM: UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE
 (B) RUE:
 (C) VILLE:
 (E) PAYS: FRANCE
 (F) CODE POSTAL:
- 20 (i) DEPOSANT:
 (A) NOM: INSTITUT PASTEUR DE LILLE
 (B) RUE:
 (C) VILLE:
 25 (E) PAYS: FRANCE
 (F) CODE POSTAL:
- (ii) TITRE DE L'INVENTION: Nouveaux variants de l'apolipoprotéine A-I
- 30 (iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 14
- (iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:
 (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
 (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
 (C) SYSTEME D'EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
 35 (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:
- 40 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 842 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: double
 45 (D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iv) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
 50 (A) ORGANISME: Homo sapiens
- (ix) CARACTERISTIQUE:
 (A) NOM/CLE: CDS
 (B) EMPLACEMENT: 1..842
 55 (D) AUTRES INFORMATIONS: /product= "human apo AI cDNA"
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:
- 60 ATG AAA GCT GCG GTG CTG ACC TTG GCC GTG CTC TTC CTG ACG GGG AGC 48
 Met Lys Ala Ala Val Leu Thr Leu Ala Val Leu Phe Leu Thr Gly Ser
 1 5 10 15

	CAG	GCT	CGG	CAT	TTC	TGG	CAG	CAA	GAT	GAA	CCC	CCC	CAG	AGC	CCC	TGG	96
	Gln	Ala	Arg	His	Phe	Trp	Gln	Gln	Asp	Glu	Pro	Pro	Gln	Ser	Pro	Trp	
				20					25					30			
5	GAT	CGA	GTG	AAG	GAC	CTG	GCC	ACT	GTG	TAC	GTG	GAT	GTG	CTC	AAA	GAC	144
	Asp	Arg	Val	Lys	Asp	Leu	Ala	Thr	Val	Tyr	Val	Asp	Val	Leu	Lys	Asp	
			35					40					45				
10	AGC	GGC	AGA	GAC	TAT	GTG	TCC	CAG	TTT	GAA	GGC	TCC	GCC	TTG	GGA	AAA	192
	Ser	Gly	Arg	Asp	Tyr	Val	Ser	Gln	Phe	Glu	Gly	Ser	Ala	Leu	Gly	Lys	
		50					55					60					
15	CAG	CTA	AAC	CTA	AAG	CTC	CTT	GAC	AAC	TGG	GAC	AGC	GTG	ACC	TCC	ACC	240
	Gln	Leu	Asn	Leu	Lys	Leu	Leu	Asp	Asn	Trp	Asp	Ser	Val	Thr	Ser	Thr	
	65					70					75					80	
20	TTC	AGC	AAG	CTG	CGC	GAA	CAG	CTC	GGC	CCT	GTG	ACC	CAG	GAG	TTC	TGG	288
	Phe	Ser	Lys	Leu	Arg	Glu	Gln	Leu	Gly	Pro	Val	Thr	Gln	Glu	Phe	Trp	
					85					90					95		
	GAT	AAC	CTG	GAA	AAG	GAG	ACA	GAG	GGC	CTG	AGG	CAG	GAG	ATG	AGC	AAG	336
	Asp	Asn	Leu	Glu	Lys	Glu	Thr	Glu	Gly	Leu	Arg	Gln	Glu	Met	Ser	Lys	
				100					105					110			
25	GAT	CTG	GAG	GAG	GTG	AAG	GCC	AAG	GTG	CAG	CCC	TAC	CTG	GAC	GAC	TTC	384
	Asp	Leu	Glu	Glu	Val	Lys	Ala	Lys	Val	Gln	Pro	Tyr	Leu	Asp	Asp	Phe	
			115					120					125				
30	CAG	AAG	AAG	TGG	CAG	GAG	GAG	ATG	GAG	CTC	TAC	CGC	CAG	AAG	GTG	GAG	432
	Gln	Lys	Lys	Trp	Gln	Glu	Glu	Met	Glu	Leu	Tyr	Arg	Gln	Lys	Val	Glu	
		130					135					140					
35	CCG	CTG	CGC	GCA	GAG	CTC	CAA	GAG	GGC	GCG	CGC	CAG	AAG	CTG	CAC	GAG	480
	Pro	Leu	Arg	Ala	Glu	Leu	Gln	Glu	Gly	Ala	Arg	Gln	Lys	Leu	His	Glu	
	145					150					155					160	
40	CTG	CAA	GAG	AAG	CTG	AGC	CCA	CTG	GGC	GAG	GAG	ATG	CGC	GAC	CGC	GCG	528
	Leu	Gln	Glu	Lys	Leu	Ser	Pro	Leu	Gly	Glu	Glu	Met	Arg	Asp	Arg	Ala	
					165					170					175		
	CGC	GCC	CAT	GTG	GAC	GCG	CTC	CCC	ACC	CAT	CTG	GCC	CCC	TAC	AGC	GAC	576
	Arg	Ala	His	Val	Asp	Ala	Leu	Arg	Thr	His	Leu	Ala	Pro	Tyr	Ser	Asp	
				180					185					190			
45	GAG	CTG	CGC	CAG	CGC	TTG	GCC	GCG	CGC	CTT	GAG	GCT	CTC	AAG	GAG	AAC	624
	Glu	Leu	Arg	Gln	Arg	Leu	Ala	Ala	Arg	Leu	Glu	Ala	Leu	Lys	Glu	Asn	
			195					200					205				
50	GGC	GGC	GCC	AGA	CTG	GCC	GAG	TAC	CAC	GCC	AAG	GCC	ACC	GAG	CAT	CTG	672
	Gly	Gly	Ala	Arg	Leu	Ala	Glu	Tyr	His	Ala	Lys	Ala	Thr	Glu	His	Leu	
		210					215					220					
55	AGC	ACG	CTC	AGC	GAG	AAG	GCC	AAG	CCC	GCG	CTC	GAG	GAC	CTC	CGC	CAA	720
	Ser	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Ala	Lys	Pro	Ala	Leu	Glu	Asp	Leu	Arg	Gln	
	225					230					235					240	
60	GGC	CTG	CTG	CCC	GTG	CTG	GAG	AGC	TTC	AAG	GTC	AGC	TTC	CTG	AGC	GCT	768
	Gly	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Glu	Ser	Phe	Lys	Val	Ser	Phe	Leu	Ser	Ala	
					245					250					255		
	CTC	GAG	GAG	TAC	ACT	AAG	AAG	CTC	AAC	ACC	CAG	TGA	GGCGCCCGCC				814
	Leu	Glu	Glu	Tyr	Thr	Lys	Lys	Leu	Asn	Thr	Gln	*					
				260					265								

GCCGCCCCC TTCCCGGTGC TCAGAATA

842

5

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

10

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 21 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: double
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

15

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iv) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: Homo sapiens

20

- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (A) NOM/CLE: CDS
 - (B) EMBLACEMENT: 1..21
 - (D) AUTRES INFORMATIONS: /product= "variant apo AI cDNA"

25

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

30

ATG CGC GAC TGC GCG CGC GCC
 Met Arg Asp Cys Ala Arg Ala
 1 5

21

35

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

40

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 21 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

45

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (D) AUTRES INFORMATIONS: /product= Sq5490

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

AAGGCACCCC ACTCAGCCAG C

21

50

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 4:

55

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
 - (B) TYPE: nucléotide
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

60

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
- (ix) CARACTERISTIQUE:
 - (D) AUTRES INFORMATIONS: /product= Sq5491

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

TTCAACATCA TCCCACAGGC CTCT

24

- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 5:
- 5 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 20 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- 10 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
(ix) CARACTERISTIQUE:
(D) AUTRES INFORMATIONS:/product= Sq5492
- 15 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:
CTGATAGCCT GGGGCGCTGG 20
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 6:
- 20 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 20 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- 25 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
(ix) CARACTERISTIQUE:
(D) AUTRES INFORMATIONS:/product= Sq5493
- 30 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:
CGCCTCACTG GGTGTTGAGC 20
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 7:
- 35 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 21 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- 40 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
(ix) CARACTERISTIQUE:
(D) AUTRES INFORMATIONS:/product= S8
- 45 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:
TGGGATCGAG TGAAGGACCT G 21
- (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 8:
- 50 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 21 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- 55 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
(ix) CARACTERISTIQUE:
(D) AUTRES INFORMATIONS:/product= S4
- 60 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

CGCCAGAAGC TGCACCAGCT G

21

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 9:

5

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 21 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

10

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(ix) CARACTERISTIQUE:

15

(D) AUTRES INFORMATIONS: /product= S6

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

GCGCTGGCGC ACCTCGTCGC T

21

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 10:

20

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 603 paires de bases

(B) TYPE: nucléotide

25

(C) NOMBRE DE BRINS: double

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(vi) ORIGINE:

30

(A) ORGANISME: Homo sapiens

(ix) CARACTERISTIQUE:

(A) NOM/CLE: CDS

(B) EMBLACEMENT: 1..603

35

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

CTA AAG CTC CTT GAC AAC TGG GAC AGC GTG ACC TCC ACC TTC AGC AAG 48
 Leu Lys Leu Leu Asp Asn Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr Phe Ser Lys
 1 5 10 15

40

CTG CGC GAA CAG CTC GGC CCT CTG ACC CAG GAG TTC TGG GAT AAC CTG 96
 Leu Arg Glu Gln Leu Gly Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu
 20 25 30

45

GAA AAG GAG ACA GAG GGC CTG AGG CAG GAG ATG AGC AAG GAT CTG GAG 144
 Glu Lys Glu Thr Glu Gly Leu Arg Gln Glu Met Ser Lys Asp Leu Glu
 35 40 45

50

GAG GTG AAG GCC AAG GTG CAG CCC TAC CTG GAC GAC TTC CAG AAG AAG 192
 Glu Val Lys Ala Lys Val Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys
 50 55 60

55

TGG CAG GAG GAG ATG GAG CTC TAC CGC CAG AAG GTG GAG CCG CTG CGC 240
 Trp Gln Glu Glu Met Glu Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu Arg
 65 70 75 80

60

GCA GAC CTC CAA GAG GGC GCG CGC CAG AAG CTG CAC GAG CTG CAA GAG 288
 Ala Glu Leu Gln Glu Gly Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu
 85 90 95

AAG CTG AGC CCA CTG GGC GAG GAG ATG CGC GAC TGC GCG CGC GCC CAT 336
 Lys Leu Ser Pro Leu Gly Glu Glu Met Arg Asp Cys Ala Arg Ala His
 100 105 110

40

5 CTG GAC GCG CTG CGC ACG CAT CTG GCC CCC TAC AGC GAC GAG CTG CGC 384
 Val Asp Ala Leu Arg Thr His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg
 115 120 125
 10 CAG CGC TTG GCC GCG CGC CTT GAG GCT CTC AAG GAG AAC GGC GGC GCC 432
 Gln Arg Leu Ala Ala Arg Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala
 130 135 140
 15 AGA CTG GCC GAG TAC CAC GCC AAG GCC ACC GAG CAT CTG AGC ACG CTC 480
 Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu
 145 150 155 160
 20 AGC GAG AAG GCC AAG CCC GCG CTC GAG GAC CTC CGC CAA GGC CTG CTG 528
 Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu
 165 170 175
 25 CCC GTG CTG GAG AGC TTC AAG GTC AGC TTC CTG AGC GCT CTC GAG GAG 576
 Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu
 180 185 190
 30 TAC ACT AAG AAG CTC AAC ACC CAG TGA 603
 Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln *
 195 200

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 11:

30 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 (D) CONFIGURATION: linéaire
 35 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
 (ix) CARACTERISTIQUE:
 (D) AUTRES INFORMATIONS:/product= alm1
 40 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:
 ATCGATACCG CCATGAAAGC TCGGGTGCTG 30

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 12:

45 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
 (B) TYPE: nucléotide
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 50 (D) CONFIGURATION: linéaire
 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
 (ix) CARACTERISTIQUE:
 (D) AUTRES INFORMATIONS:/product= alm2
 55 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:
 ATGGGCGCGC GCGCAGTCGC GCATCTCCTC 30

60

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 5 (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
(ix) CARACTERISTIQUE:
(D) AUTRES INFORMATIONS:/product= alm3
- 10 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:
GAGGAGATCC GCGACTGCGC GCGCGCCCAT 30
- 15 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 14:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 30 paires de bases
(B) TYPE: nucléotide
20 (C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc
(ix) CARACTERISTIQUE:
25 (D) AUTRES INFORMATIONS:/product= alm4
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:
GTCGACGGCG CCTCACTGGG TGTTGAGCTT 30

REVENDICATIONS

1. Variant de l'apolipoprotéine A-I humaine comprenant une cystéine en position 151.
2. Variant selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il comprend la
5 séquence peptidique SEQ ID n° 2.
3. Variant selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce qu'il s'agit de l'apoA-I Paris.
4. Variant selon les revendications 1 à 3 caractérisé en ce qu'il s'agit d'une protéine recombinante.
- 10 5. Variant selon l'une des revendications 1 à 4 sous forme de dimère.
6. Variant selon la revendication 5 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un homodimère.
7. Acide nucléique codant pour un variant d'apolipoprotéine A-I selon l'une des revendications précédentes.
- 15 8. Acide nucléique selon la revendication 7 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un ADNc.
9. Acide nucléique selon la revendication 7 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un ADNg.
10. Acide nucléique selon la revendication 7 caractérisé en ce qu'il
20 s'agit d'un ARN.
11. Acide nucléique selon l'une des revendications 7 à 9 caractérisé en ce qu'il comprend la séquence nucléique SEQ ID n° 2.
12. Vecteur comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 7 à 11.

13. Vecteur selon la revendication 11 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur viral.

14. Vecteur selon la revendication 11 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un vecteur chimique.

5 15. Adénovirus recombinant défectif comprenant, inséré dans son génome, un ADN codant pour un variant de l'apolipoprotéine A-I selon la revendication 1.

16. Cellule modifiée génétiquement par insertion d'un acide nucléique selon la revendication 7.

10 17. Implant comprenant des cellules de mammifères génétiquement modifiées par insertion d'un acide nucléique selon la revendication 7 et une matrice extracellulaire.

15 18. Composition pharmaceutique comprenant un variant de l'apolipoprotéine A-I selon l'une des revendications 1 à 6, et/ou un acide nucléique selon la revendication 7, et/ou un vecteur selon la revendication 12 et/ou une cellule génétiquement modifiée selon la revendication 16.

1/8

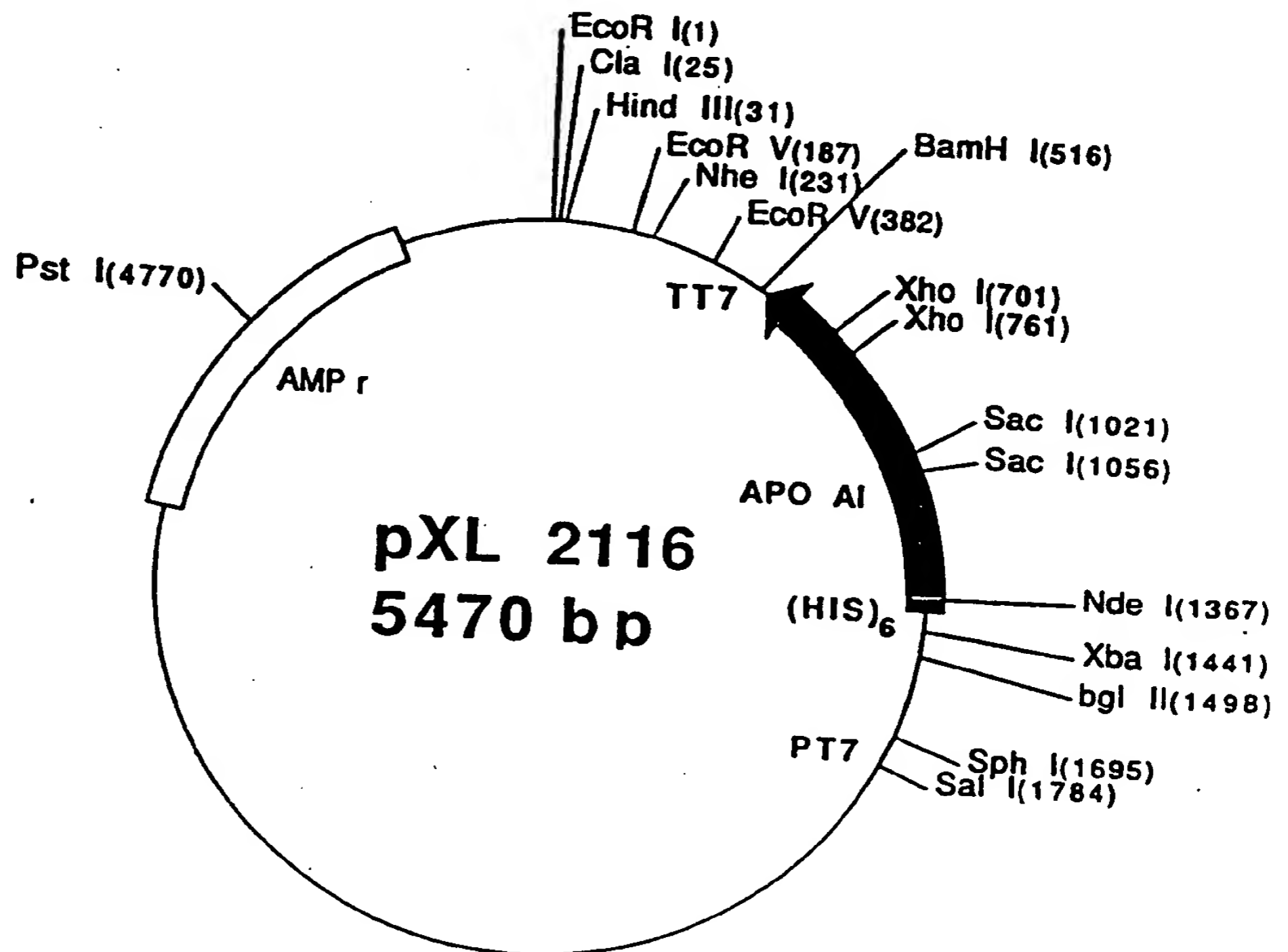


Figure 1

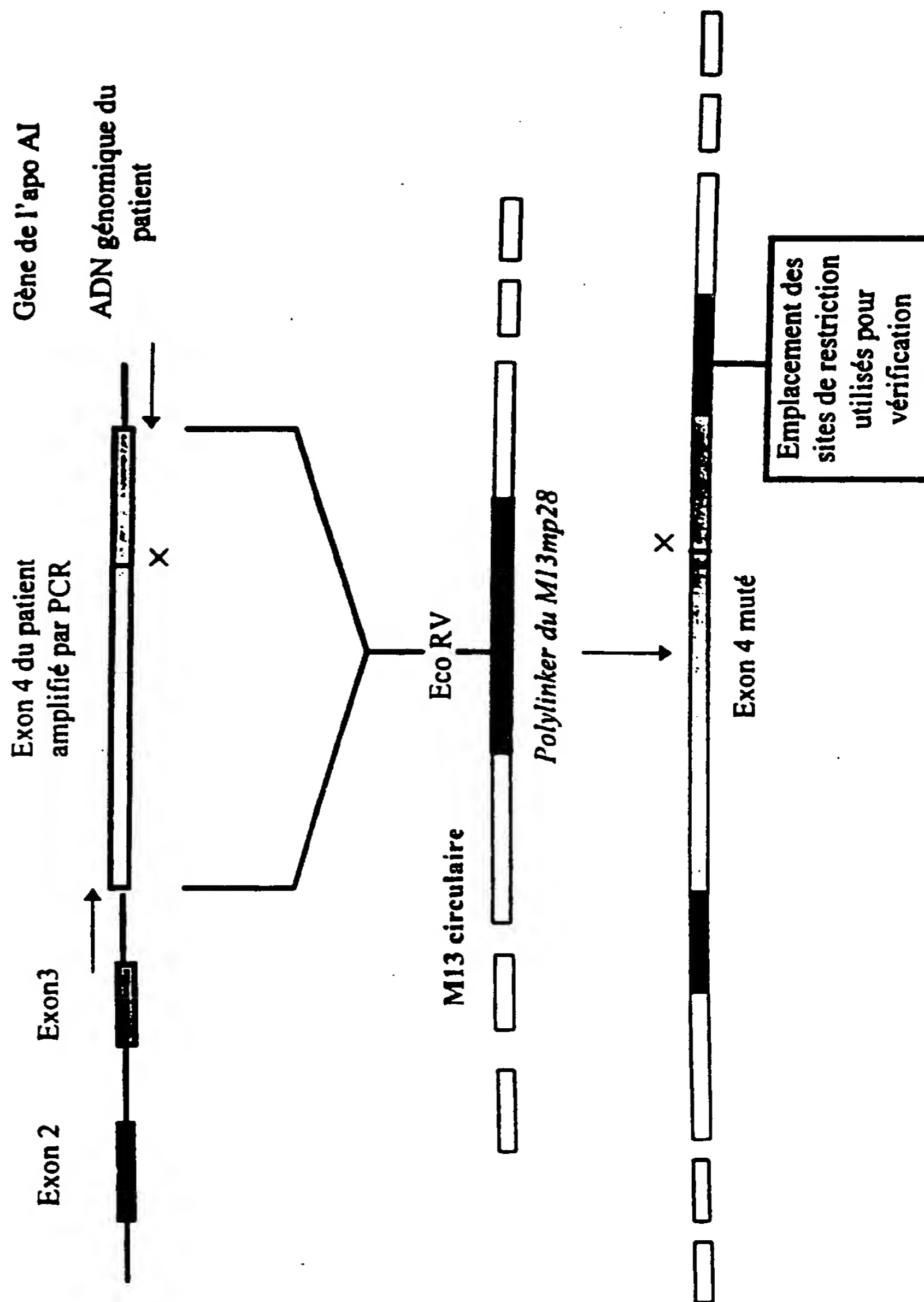


Figure 2

FEUILLE DE REMPLACEMENT (RÈGLE 26)

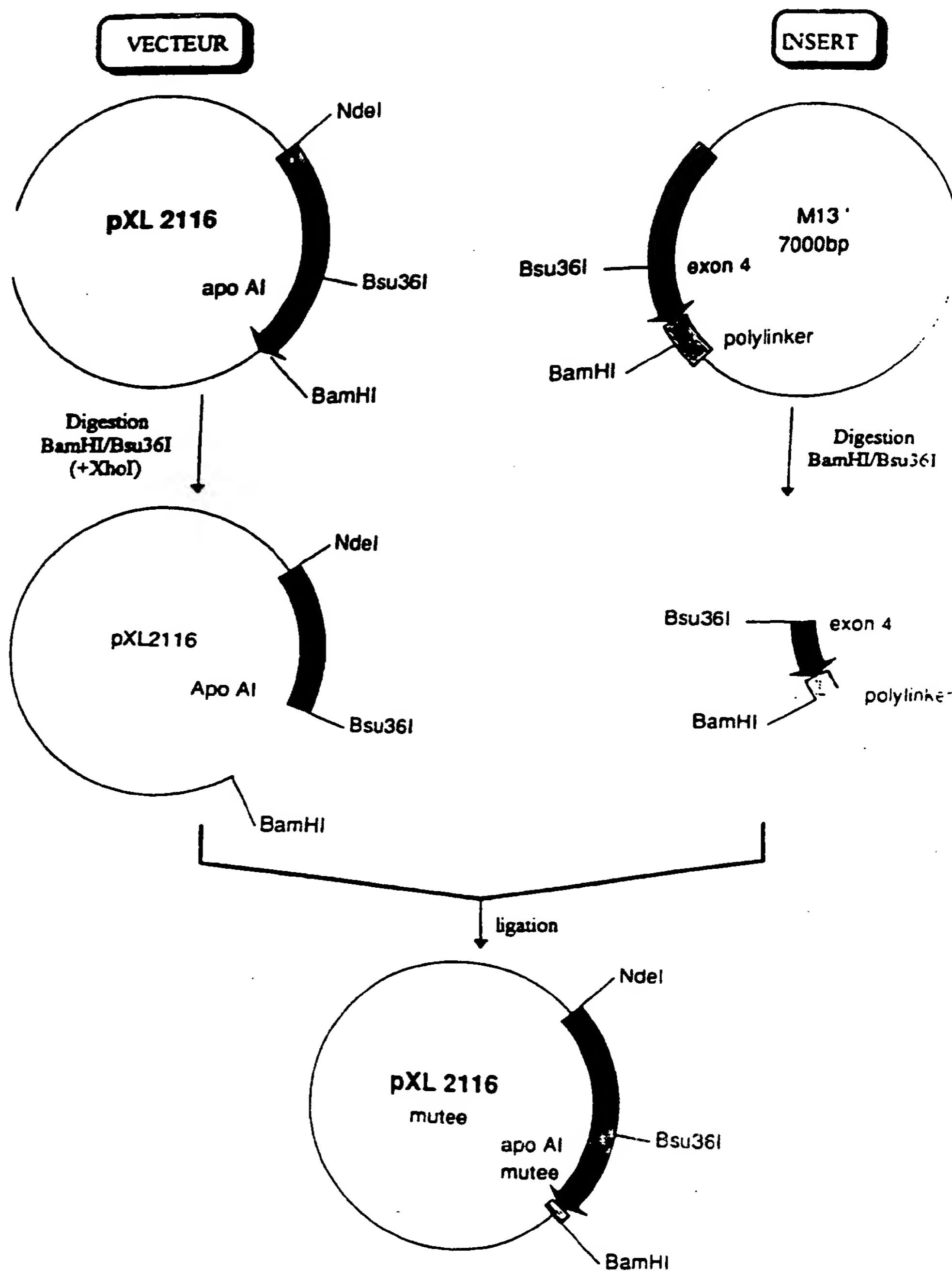


Figure 3

4/8

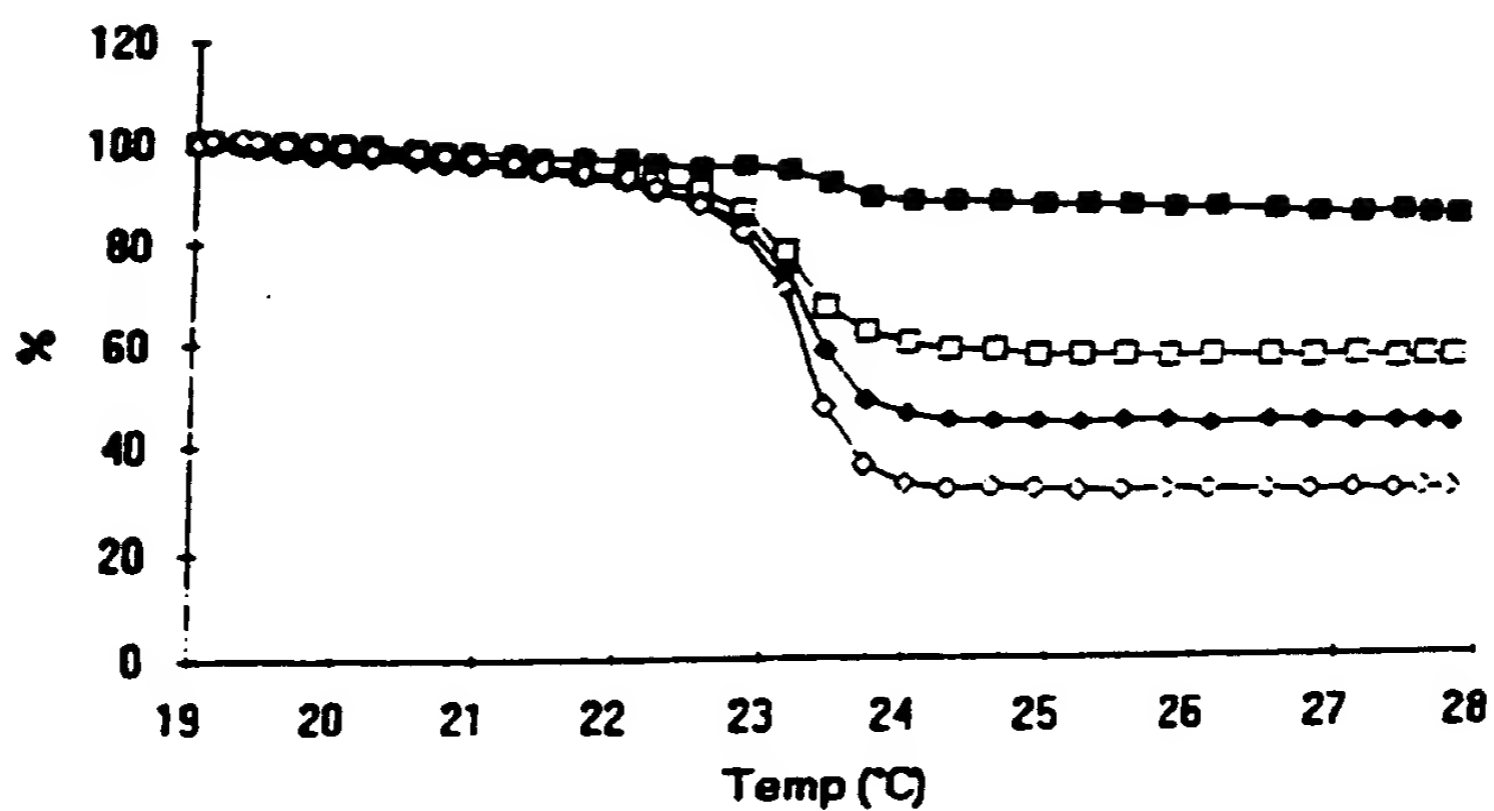


Figure 4a

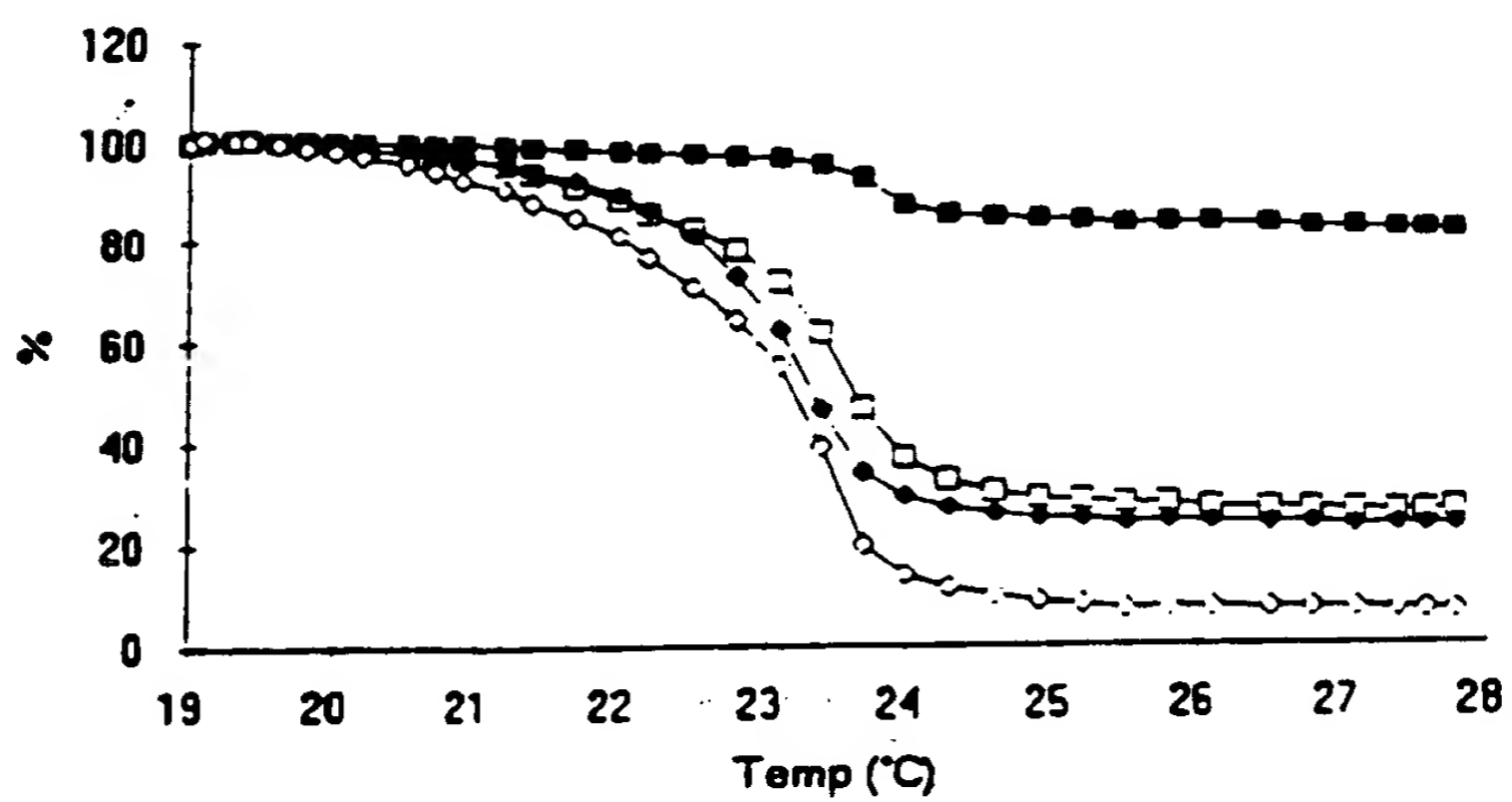


Figure 4b

5/8

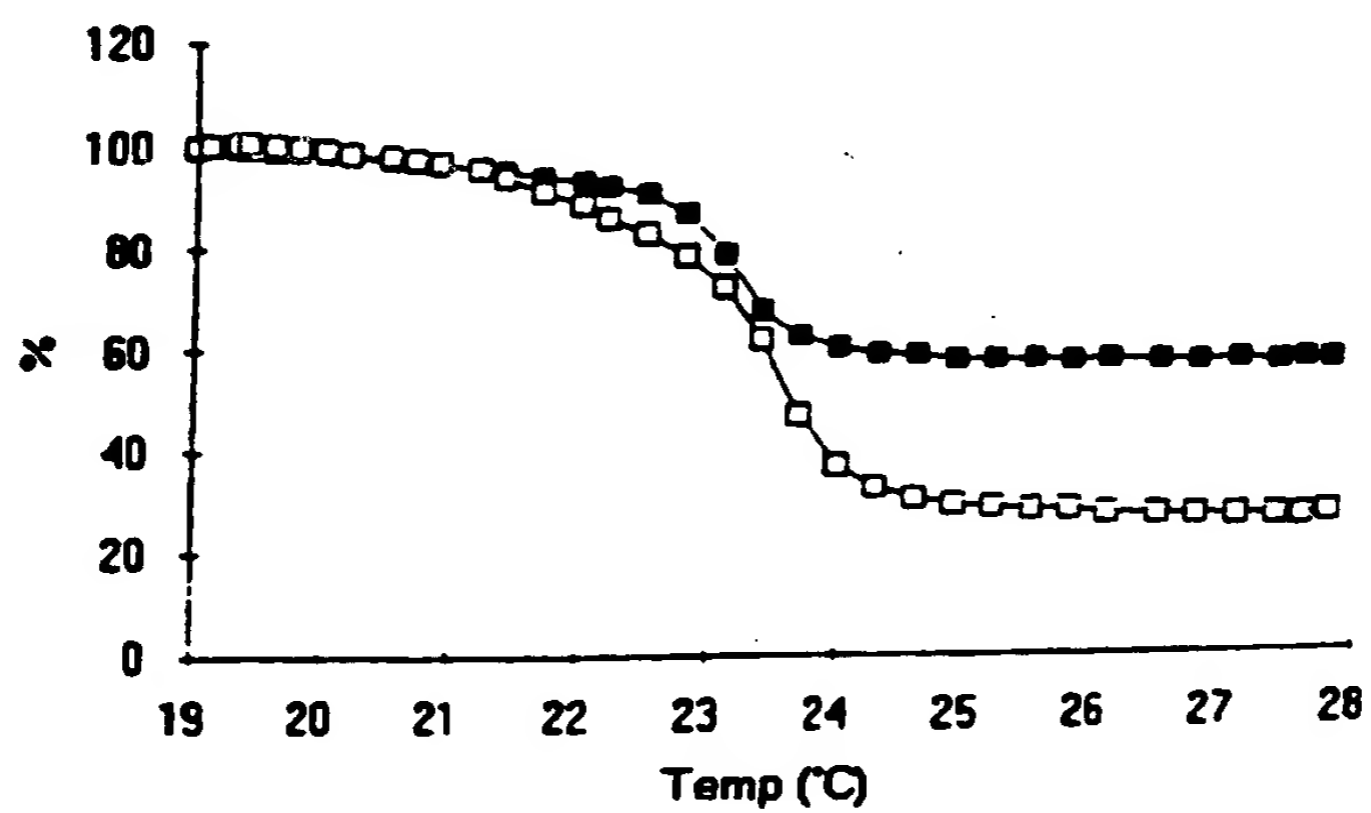


Figure 4c

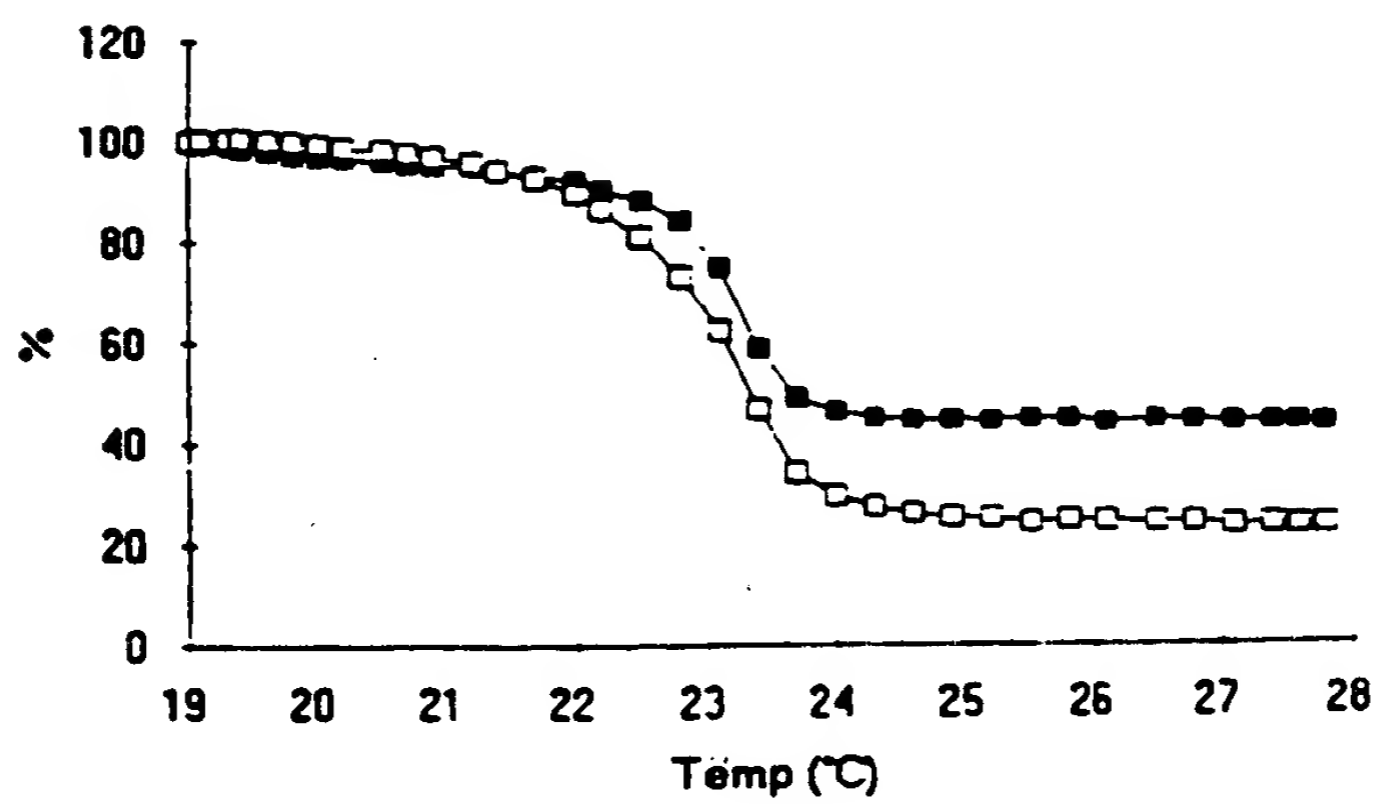


Figure 4d

FEUILLE DE REMPLACEMENT (RÈGLE 26)

6/8

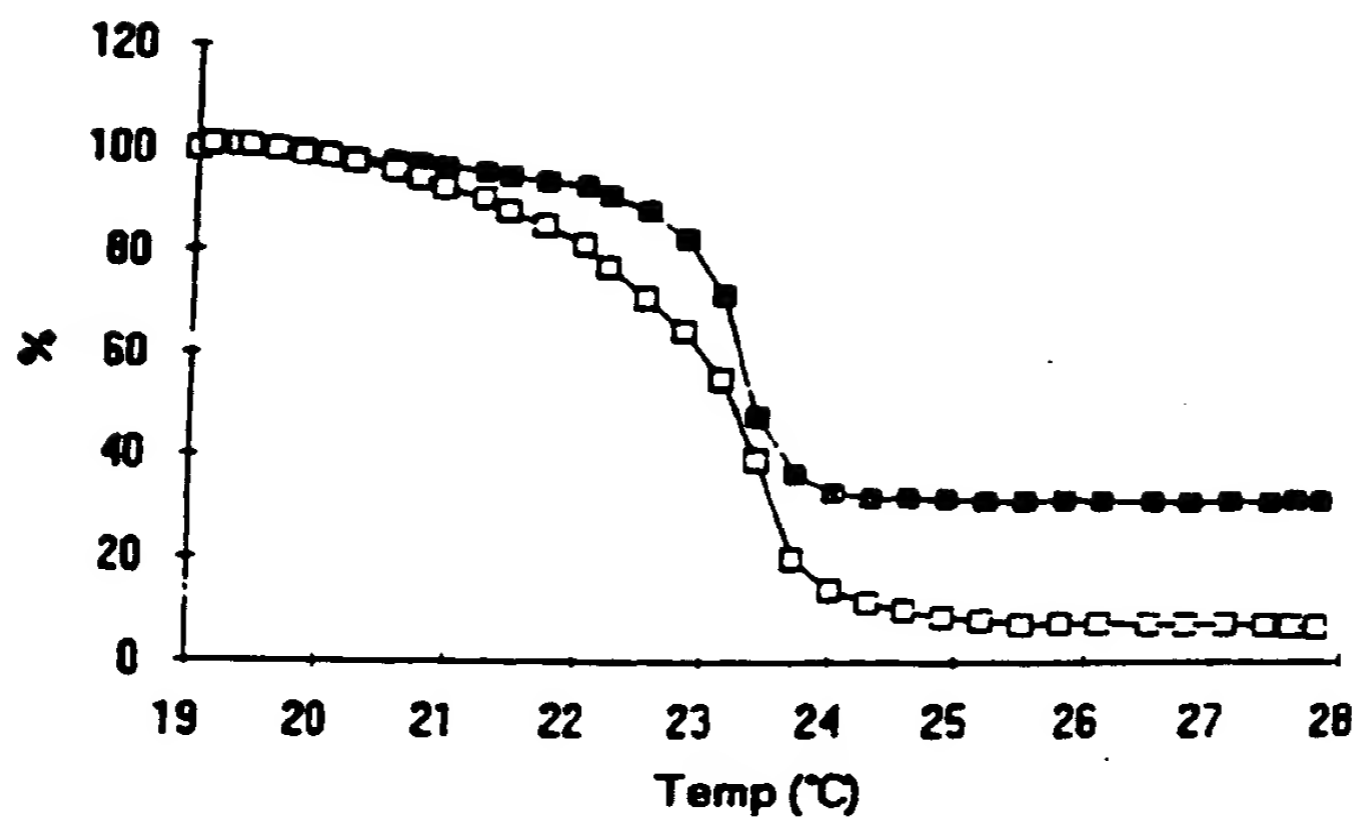


Figure 4e

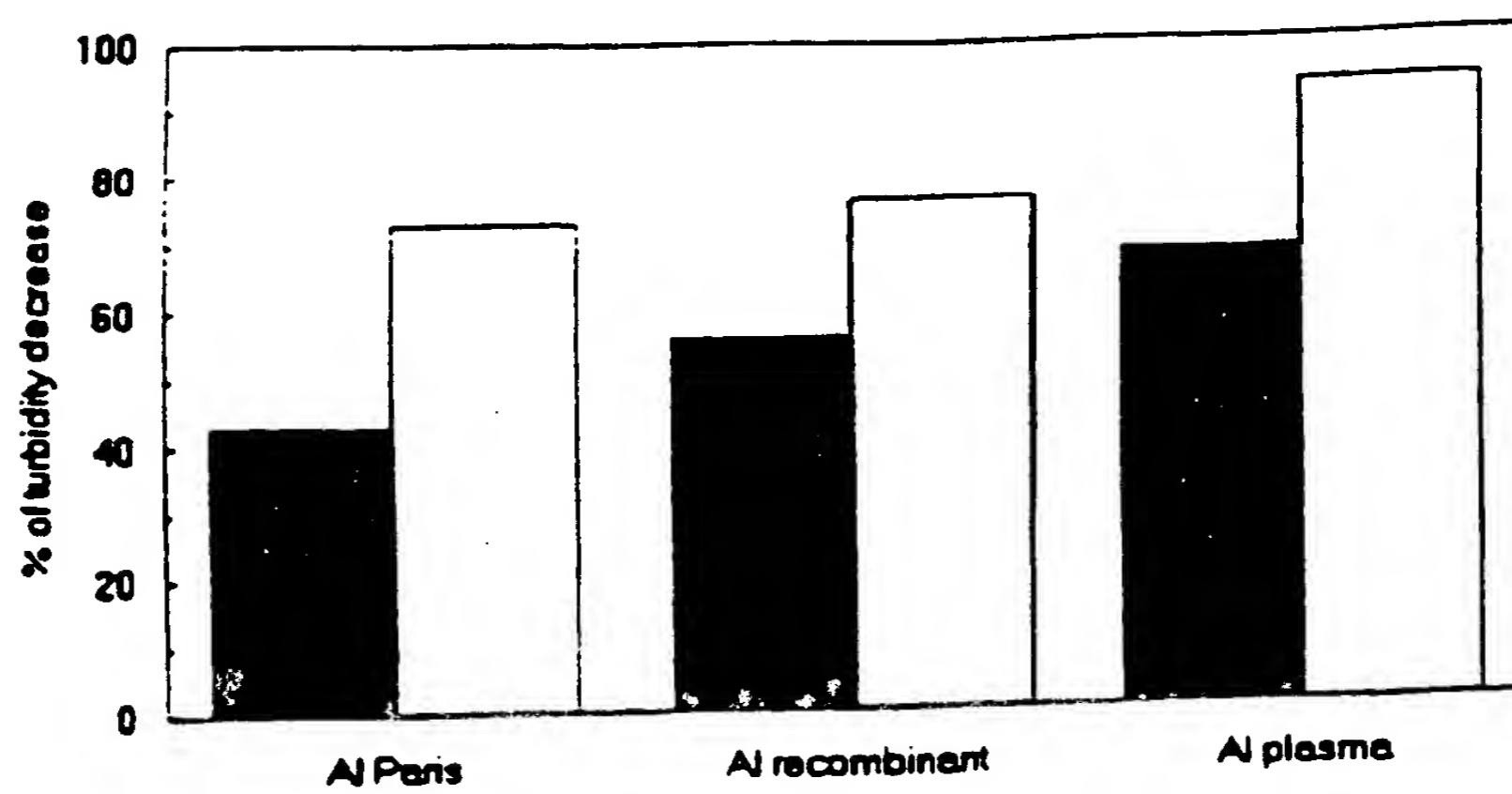


Figure 4f

7/8

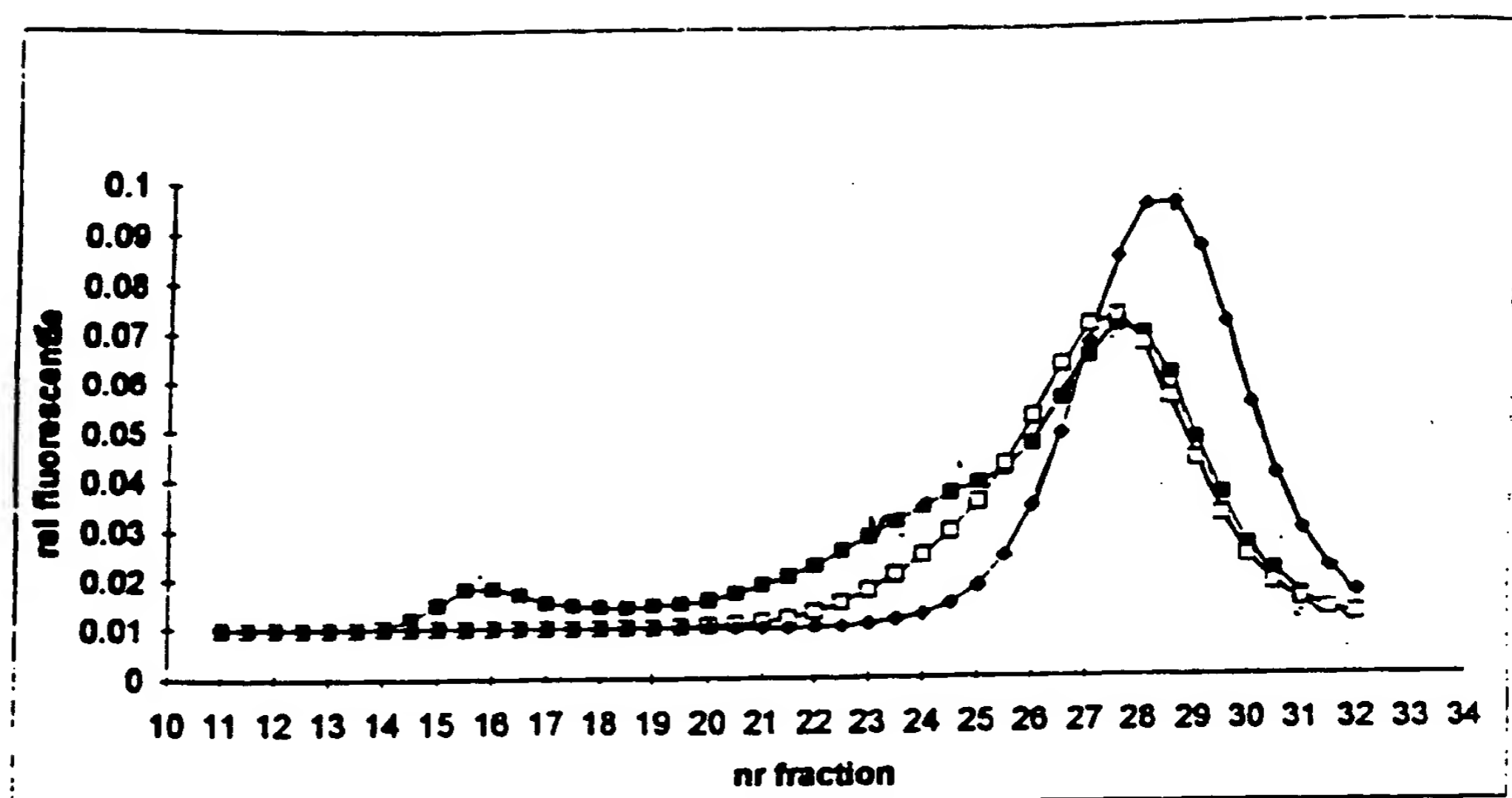


Figure 5

8/8

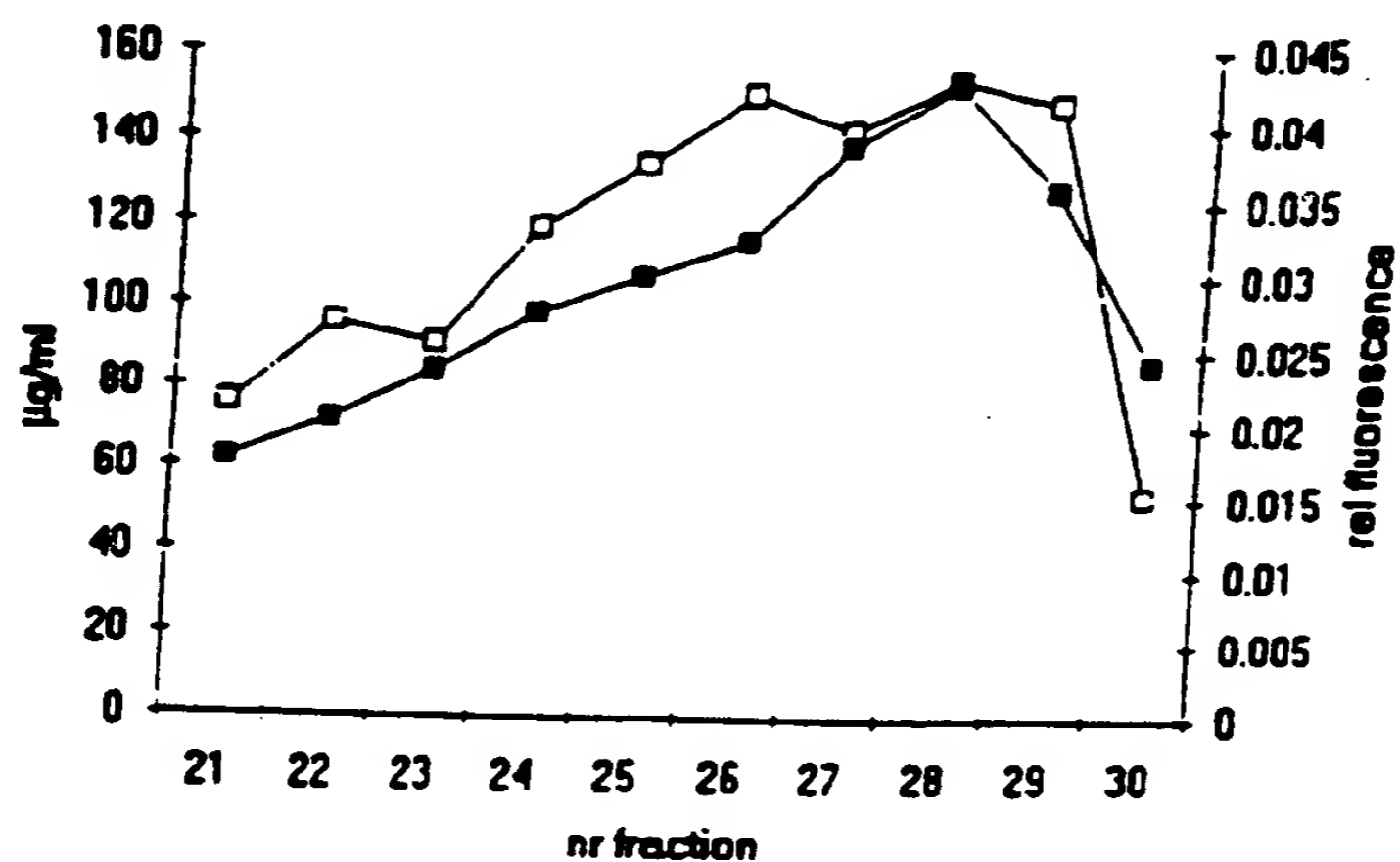


Figure 6a

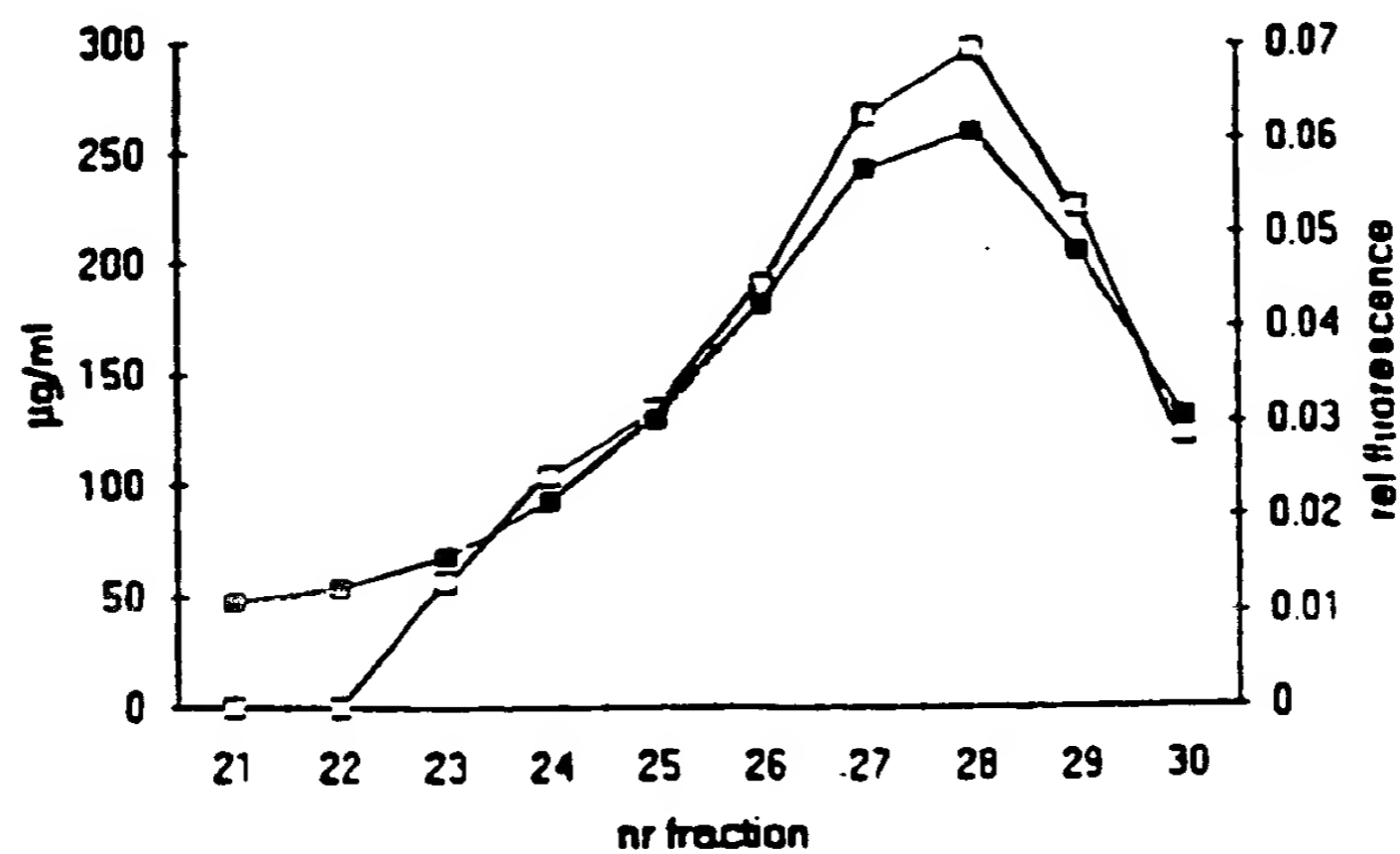


Figure 6b

FEUILLE DE REMPLACEMENT (RÈGLE 26)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat Application No
PC1/FR 96/00747

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/12 C12N15/86 C12N15/87 C12N5/10 C07K14/775
A61K48/00 A61K9/00 A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,94 25073 (RHONE-POULENC RORER) 10 November 1994 see column 5 see page 11 - page 16	1-16,18
A	WO,A,93 12143 (KABI PHARMACIA AB) 24 June 1993 see the whole document --- -/--	1-16,18

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 August 1996

Date of mailing of the international search report

03.09.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gac, G

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PC1/FR 96/00747

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, vol. 962, no. 1, 1988, pages 131-142, XP000561828 HERZYCK ET AL: "The secondary structure of apolipoproteins in human HDL3 particles after chemical modification of their Tyrosine, Lysine, Cysteine or Arginine residues : a Fournier transform infrared spectroscopy study" see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-3
A	<p>DATABASE SWISSPROT an: P05501, 1 November 1988 XP002011323 see abstract & J. MOL. BIOL., vol. 184, 1985, pages 353-366, LANG ET AL.: * sequence *</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	2,11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PC1/FR 96/00747

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9425073	10-11-94	FR-A- 2704556	04-11-94
		AU-B- 6572294	21-11-94
		BR-A- 9406689	30-01-96
		CA-A- 2161679	10-11-94
		EP-A- 0701450	20-03-96
		FI-A- 955154	27-10-95
		NO-A- 954286	26-10-95
		ZA-A- 9402980	18-01-95

WO-A-9312143	24-06-93	AU-B- 3175593	19-07-93
		BG-A- 98036	27-05-94
		BR-A- 9205640	03-05-94
		CZ-A- 9301589	13-07-94
		EP-A- 0571602	01-12-93
		HU-A- 70270	28-09-95
		JP-T- 7502892	30-03-95
		NZ-A- 246223	25-06-96
		PL-A- 300262	07-03-94
		SK-A- 86893	06-04-94
		ZA-A- 9208989	17-05-93

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den : Internationale No
PC1/FR 96/00747

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N15/12 C12N15/86 C12N15/87 C12N5/10 C07K14/775
A61K48/00 A61K9/00 A61K38/17

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 6 C12N C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO,A,94 25073 (RHONE-POULENC RORER) 10 Novembre 1994 voir colonne 5 voir page 11 - page 16 ---	1-16,18
A	WO,A,93 12143 (KABI PHARMACIA AB) 24 Juin 1993 voir le document en entier --- -/--	1-16,18

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

2

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 Août 1996

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

0 3. 09. 96

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Gac, G

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem Internationale No
PC 1 / FR 96/00747

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA, vol. 962, no. 1, 1988, pages 131-142, XP000561828 HERZYCK ET AL: "The secondary structure of apolipoproteins in human HDL3 particles after chemical modification of their Tyrosine, Lysine, Cysteine or Arginine residues : a Fournier transform infrared spectroscopy study" voir le document en entier ---</p>	1-3
A	<p>DATABASE SWISSPROT an: P05501, 1 Novembre 1988 XP002011323 voir abrégé & J. MOL. BIOL., vol. 184, 1985, pages 353-366, LANG ET AL.: * séquence * -----</p>	2,11

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem Internationale No

PCT/FR 96/00747

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9425073	10-11-94	FR-A- 2704556	04-11-94
		AU-B- 6572294	21-11-94
		BR-A- 9406689	30-01-96
		CA-A- 2161679	10-11-94
		EP-A- 0701450	20-03-96
		FI-A- 955154	27-10-95
		NO-A- 954286	26-10-95
		ZA-A- 9402980	18-01-95

WO-A-9312143	24-06-93	AU-B- 3175593	19-07-93
		BG-A- 98036	27-05-94
		BR-A- 9205640	03-05-94
		CZ-A- 9301589	13-07-94
		EP-A- 0571602	01-12-93
		HU-A- 70270	28-09-95
		JP-T- 7502892	30-03-95
		NZ-A- 246223	25-06-96
		PL-A- 300262	07-03-94
		SK-A- 86893	06-04-94
		ZA-A- 9208989	17-05-93

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)